Développement de modèles standardisés pour l'étude des aérosols viraux

Mémoire

Mélissa Marcoux-Voiselle

Maîtrise en microbiologie
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Mélissa Marcoux-Voiselle, 2014

Résumé

La dispersion des virus dans l'air est un phénomène encore mal compris. La transmission par contact direct avec une personne infectée ou indirecte via des surfaces contaminées a été largement documentée, mais la littérature sur les aérosols viraux reste pauvre. L'aérosolisation de virus pathogènes requérant d'importantes mesures de biosécurité, des modèles de virus non pathogènes constitueraient des outils précieux dans l'étude des aérosols viraux. Ce projet vise le développement de modèles standardisés pour l'étude des aérosols viraux. Ainsi, des phages ont été testés comme modèles de virus eucaryotes. Pour évaluer leur résistance aux stress environnementaux et aux différents temps d'exposition, ces phages ont été aérosolisés dans une chambre rotative où ils ont été exposés à diverses conditions environnementales (humidité relative [HR], température, UV) et temps. Les résultats obtenus suggèrent que les phages choisis pourraient être de bons modèles pour l'étude du comportement des virus dans l'air.

Abstract

The spread of virus in the air is a poorly understood phenomenon. Transmission by direct contact with an infected person or by indirect contact via contaminated surfaces has been widely documented, but the literature on viral aerosols remains poor. Because the aerosolization of pathogenic viruses requiring significant biosecurity measures, the availability of non-pathogenic viral models would be a valuable tool in the study of viral aerosols. The aim of this project is to develop standardized models for the study of viral aerosols. Consequently, phages were tested as models for eukaryotic viruses. To evaluate their resistance to environmental stresses and to different exposure times, these phages were aerosolized in a rotating chamber where they were exposed to various environmental conditions (relative humidity [RH], temperature, UV) and time. The results suggest that the selected phages could be good models for studying the behavior of the virus in the air.

Table des matières

Résumé iii
Abstract v
Table des matières vii
Liste des figures iix
Liste des tableaux xi
Liste des abréviations xiiii
Remerciements xvv
Chapitre 1 : Introduction 1
1.1 Les aérosols 1
1.1.1 Définitions générales 1
1.1.2 Le diamètre aérodynamique (d_a) 2
1.1.3 Le comportement des particules dans l'air 2
1.1.4 Les bioaérosols 6
1.1.5 Les virus 7
1.1.6 L'aérovirologie 8
1.1.7 Les chambres de génération 9
1.1.7.1 Les chambres statiques 10
1.1.7.2 Les chambres rotatives 10
1.1.7.3 Les nébuliseurs 14
1.2 La transmission virale 16
1.2.1 Évolution des croyances 16
1.2.2 Généralités 17
1.2.3 Transmission via les aérosols 19
1.2.3.1 Généralités 19
1.2.3.2 Cas possibles de transmission par l'air 22
1.2.3.3 Effet de différents facteurs sur la persistance des virus dans l'air 24
1.3 Les bactériophages comme modèles viraux 30
1.3.1 Généralités 30
1.3.2 Leur utilisation en tant que modèles 31
1.3.3 PR772 31
1.3.4 Phi6 32
1.3.5 PhiX174 32
1.3.6 MS2 32
1.4 Virus eucaryote à l'étude : l'*Influenza* 34

1.5 Objectif des travaux de recherche 36
1.5.1 Objectifs spécifiques 36
Chapitre 2 : Matériel et méthodes 39
2.1 Bactériophages 39
2.2 Nébulisat 40
2.3 Génération d'aérosols 40
2.4 Contrôle de l'humidité et de la température 40
2.5 Exposition aux stress environnementaux 41
2.6 Échantillonnage des particules virales 41
2.7 Essais de plaques 42
2.8 Extraction de l'ARN 42
2.9 Synthèse de l'ADN complémentaire 43
2.10 Amorces et sondes 43
2.11 Réaction en chaîne de polymérisation quantitative (qPCR) 43
2.12 Analyse des résultats 45
2.13 Évaluation des performances de la CER 45
2.14 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes humidités relatives 47
2.15 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes températures 48
2.16 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles aux U.V. 48
2.17 Étude pilote : validation des modèles avec virus eucaryote 49
Chapitre 3 : Résultats 53
3.1 Évaluation de la performance de la CER 53
3.2 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes humidités relatives 56
3.3 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes températures 57
3.4 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles aux U.V. 60
3.5 Étude pilote : Validation des modèles avec un virus eucaryote 62
Chapitre 4 : Discussion 65
4.1 Évaluation de la performance de la CER 65
4.2 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes humidités relatives 67
4.3 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes températures 69
4.4 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles aux UV 71
4.5 Étude pilote : Validation des modèles avec virus eucaryote 72
5. Conclusion et perspectives 75
Bibliographie 77

Liste des figures

Figure 1: Formation d'un noyau de gouttelette. xv

Figure 2: Déplacement du diamètre limite en fonction de l'humidité relative. 4

Figure 3: Schématisation du comportement des particules dans l'air. 6

Figure 4: Virus de l'Influenza. 8

Figure 5: Différents type de chambres dynamiques.. 11

Figure 6: Trajectoire des particules à l'intérieur dune chambre rotative 12

Figure 7: Fraction du nombre initial de particules en fonction du temps selon la grosseur des particules qui reste en suspension dans la chambre rotative.… 13

Figure 8 : Distribution des particules produites par le Collison selon leur diamètre aérodynamique (µm).. 15

Figure 9: Transmission courte et longue distance. 18

Figure 10: Parcours aérobiologique des maladies transmissibles pas l'air. 22

Figure 11: Virus de l'Influenza par microscopie électronique.. 35

Figure 12: Graphique du pourcentage du contenu de la chambre récolté par le SKC Biosampler®, selon le temps d'échantillonnage. 42

Figure 13: Chambre environnementale rotative.. 46

Figure 14 : Chambre environnementale rotative.. 47

Figure 15: Schéma du test d'hémagglutination. 51

Figure 16: Modulation de la température dans la CER. 54

Figure 17: Évolution du nombre de particules dans la CER. 55

Figure 18: Évolution du MMAD dans la CER en fonction du temps 55

Figure 19: Effet de l'humidité sur l'infectivité des phages en fonction du temps de suspension à 18°C. 58

Figure 20: Effet de la température sur l'infectivité des phages en fonction du temps de suspension à 80% HR…….59

Figure 21: Exposition des phages aux UV…….60

Figure 22: Pourcentage d'infectivité des quatre phages en fonction de la dose d'exposition aux UV……...61

.

Figure 23: Pourcentage d'infectivité du virus de l'*Influenza* (*Flumist*) en fonction du temps à deux humidités relatives (20 et 80%)…….63

Figure 24: Contribution relative de l'attachement, l'injection et la réplication dans la perte d'infectivité, selon le mode de désinfection choisi……70

.

Liste des tableaux

Tableau 1: Ensemble des caractéristiques des quatre phages modèles choisis...33
Tableau 2 : Caractéristiques du virus de l'*Influenza*……35
Tableau 3 : Les concentrations des sondes et amorces pour les réactions des quatre phages et volumes d'échantillon ajoutés au mix……44
Tableau 4 : Amorces et sondes utilisées pour les réactions PCR……..44
Tableau 5 : Constante K et R^2 pour les quatre phages pour les expérimentations avec les UV……61

Liste des abréviations

°C	Degré Celsius
%	Pourcent
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
µl	Microlitre
µm	Micromètre
µM	Micromolaire
mM	Millimolaire
ml	Millilitre
nm	Nanomètre
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	ADN double brin
ADNsb	ADN simple brin
ARN	Acide ribonucléique
pb	Paire de bases
rpm	Rotation par minute
FMDV	Food-and-Mouth virus
NDV	Newcastle Disease Virus
IBR	rhinotrachéite infectieuse bovine
VSV	Vesicular stomatitis Virus
VSR	Virus sarcome de Rous
SARS	Severe acute respiratory syndrome
EMC	Encéphalomyocardite
da	Diamètre aérodynamique
UV	Ultraviolets
OMS	Organisation mondiale de la santé
PTFE	polytétrafluoroéthylène
MMAD	Diamètre aérodynamique de la masse médiane
mW	Milliwatt
HA	Hémaglutinine
CER	Chambre environnementale rotative

Remerciements

À ma deuxième année de baccalauréat, j'avais à mon horaire le cours "Isolement et Culture des Microorganismes". Dès les premières heures, il n'a suffit que d'un regard entre mon complice et moi pour comprendre que nous avions devant nous quelqu'un d'extraordinaire.

C'est d'abord ta façon d'enseigner qui m'a attiré: tellement énergique et entrecoupée de «*il faut que je vous raconte mon rêve d'hier*» ou de «*c'est comme la fois où de mes étudiants à mis quelque chose à l'autoclave et qu'on ne l'a jamais retrouvé* (ce n'était pas Marc ça en plus finalement?!?) ». Ensuite, j'ai été ébahie par l'étendue de tes connaissances, tu as d'ailleurs remarqué à quel point je buvais tes paroles. Et finalement, ton humilité a fait en sorte que je t'ai placée à un endroit bien spécial dans mon cœur, celui des gens extraordinaires qu'on croise que très rarement dans une vie et qui nous marquent à jamais. Merci Caro.

Merci à Marc, mon premier mentor. La scientifique que je suis aujourd'hui c'est en grande partie grâce à toi. Et peut-être aussi quelques cheveux blancs à force de me faire faire des sauts ;). Merci pour tout et même plus.

Merci à Nathalie de m'avoir tout appris de l'aérovirologie, et qui au final m'a aussi permis de développer mes aptitudes à : poser les pôles à rideau, changer la tuyauterie, refaire des scellants, etc. Ta générosité est éternelle, merci pour tout.

Merci à Pascale, une belle surprise dans ma maîtrise. Je t'ai tout dit, tu m'as tout dit. Merci d'avoir été toi, et merci de m'avoir laissé être moi. Je t'aime et à bientôt.

Merci à mon siamois, pour toutes les raisons que tu sais déjà et qui seraient trop longues à énumérer ici. Je te rends visite à Montréal, t'inquiètes ;).

Merci aussi à Valérie, Laetitia, Anne, Phillipa, Éric, Martyne, et Léa, ainsi que les membres de mon comité, Sylvain et Steve, qui ont fait de ma maîtrise une aventure des plus agréables.

Un merci bien spécial à mon amour de toujours, Mathieu, qui m’a toujours soutenue dans les hauts comme dans les creux. Sans ton amour je n’y serais pas arrivé.

On passe une moitié de la vie à attendre ceux que l'on aimera et l'autre moitié à quitter ceux qu'on aime.»

Victor Hugo, Tas de pierres, 1901

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Les aérosols

1.1.1 Définitions générales

On entend par aérosols toutes particules solides ou liquides, pouvant être organiques ou inorganiques, qui se retrouvent en suspension dans l'air. Ces particules sont soit produites de façon naturelle, par les volcans, les feux de forêt ou l'érosion éolienne des sols, ou de façon artificielle par l'action de l'homme, telles que par les voitures ou les activités industrielles [3].

Généralement, les aérosols ont un diamètre aérodynamique compris entre 0,002 et 100 µm [4]. Des particules de plus gros diamètre peuvent se retrouver en suspension dans l'air, mais vont sédimenter trop rapidement pour être considérées comme des aérosols. Les particules de moins de 0,002 µm, quant à elles, se comportent plus tels des gaz que comme des particules [3].

L'étude des aérosols est très large. Pour ne nommer que quelques domaines, il y a l'étude de la pollution atmosphérique, de la qualité de l'air ambiant, des phénomènes atmosphériques comme la formation des nuages, de la combustion et de l'instrumentation reliée à ce domaine. On peut aussi nommer l'étude de la transmission des maladies via les aérosols, qui en est encore à ses débuts, mais en plein essor depuis quelques années. L'étude des aérosols est aussi une science multidisciplinaire. Elle fait appel autant aux microbiologistes, biochimistes, qu'aux physiciens et ingénieurs.

1.1.2 Le diamètre aérodynamique (d_a)

Dans l'étude du comportement des particules dans l'air, le terme *diamètre aérodynamique* est couramment utilisé. En effet, les particules en suspension dans l'air peuvent être de différentes formes, telles que sphériques, cubiques, fibreuses, en agrégats, en plaque ou irrégulières [3]. Le diamètre aérodynamique de ces particules correspond au diamètre d'une particule sphérique homogène, telle une goutte d'eau, ayant la même vitesse de déposition. Donc, peu importe la forme des particules en suspension, si leur d_a est le même, elles auront sensiblement le même comportement dans un environnement donné (temps de suspension et site de déposition dans les poumons par exemple). Cette propriété est mise à profit dans plusieurs techniques d'échantillonnage de l'air afin de séparer les aérosols ou dans des appareils de mesure, tel le mesureur aérodynamique de particules. En effet, le diamètre aérodynamique aura un impact direct sur le transport des particules dans un flot d'air et donc, dans un échantillonneur ou un appareil de mesure.

1.1.3 Le comportement des particules dans l'air

Peu importe le mécanisme de production des aérosols, que ce soit par éternuement ou par mouvement des vagues à la surface des océans par exemple, les particules produites vont se transformer au contact de l'atmosphère. La figure 1 illustre bien ce phénomène. La particule de départ, que l'on va souvent nommer gouttelette, voit ses liquides s'évaporer au contact de l'atmosphère pour évoluer jusqu'au noyau de gouttelette, constitué de particules solides (sels, bactéries, virus, moisissures, pollen, etc.). Mais, ce ne sont pas toutes les gouttelettes qui deviennent des noyaux de gouttelette. Pour ce faire, il faut que l'eau (ou autre solvant liquide) puisse s'évaporer avant que la particule entre en contact avec une surface. Plusieurs facteurs vont influencer la vitesse à laquelle une gouttelette se transforme en noyau de gouttelette. On peut entre autres citer l'humidité relative, la température ou la vitesse du vent de l'environnement en question [5].

Xie *et al.* 2007, ont mené des travaux très intéressants sur le comportement des gouttelettes dans différents environnements. Dans la figure 2 A, les plus petites gouttelettes, moins de 125 µm, ont un temps d'évaporation plus court (courbe AB) ainsi qu'un temps de sédimentation plus court (courbe BC). La jonction entre les deux courbes, indiquée par le point B, représente la taille de particules limite qui peut s'évaporer avant d'entrer en contact avec le sol (hauteur de 2 mètres) dans les conditions environnementales de l'expérimentation [5]. De plus, sur la section B de la figure, on voit à quel point l'humidité relative de l'environnement à un impact sur la grosseur limite de particules pouvant être transformées en noyaux de gouttelettes. Par exemple, pour des humidités relatives de 0% et 90%, la limite est 125 et 60 µm respectivement. L'importance de la différenciation entre ces deux types de particules, gouttelette et noyau de gouttelette, sera discutée à la section 1.2.2.

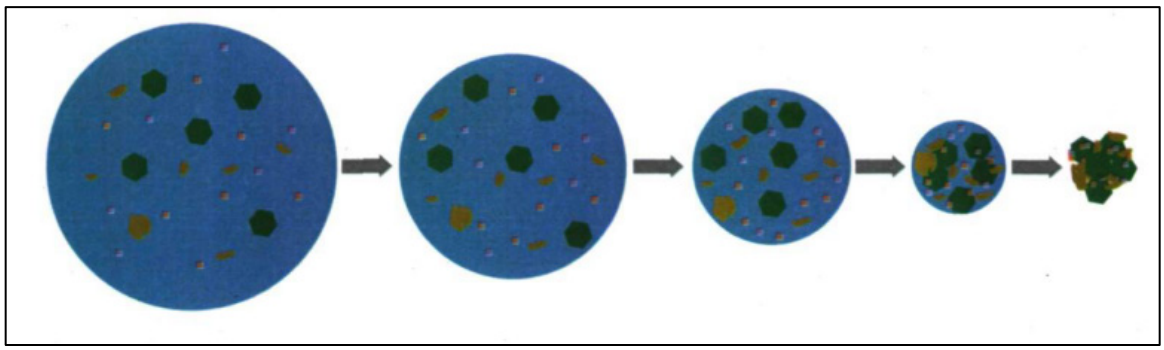


Figure 1: Formation d'un noyau de gouttelette. Le noyau se forme (droite) à partir d'une gouttelette (gauche) par évaporation du liquide et concentration des solides [1]. Figure tirée de [1].

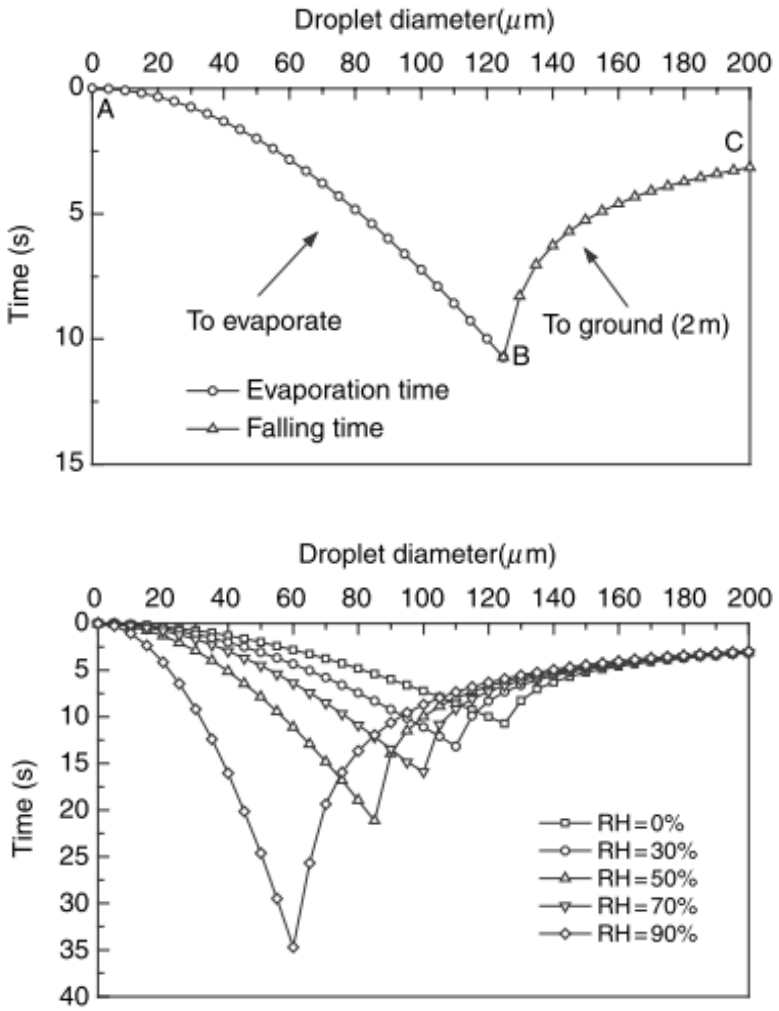


Figure 2: Déplacement du diamètre limite en fonction de l'humidité relative. En A, la vitesse d'évaporation et de sédimentation selon le diamètre des particules (µm). En B, il s'agit des mêmes courbes, mais sous différentes conditions d'humidités relatives [5]**.** Figure tirée de [5].

Une fois sous forme de noyaux de gouttelettes, les aérosols vont se déplacer suivant les courants d'air (vent extérieur, ventilation, courant de convection, mouvement humain, etc.). Le comportement des particules en suspension dans l'air dépend fortement de leur diamètre aérodynamique et plusieurs paramètres peuvent moduler la taille des aérosols. Ces derniers sont composés de sels, de protéines, de matière organique et inorganique, en plus de matériel biologique. Dans le cas d'un bioaérosol provenant d'une personne infectée par un virus responsable du rhume ou de la grippe, les particules

produites lors de la toux, par exemple, contiendront des virus, mais la taille du virion en tant que tel n'influencera pas la grosseur de l'aérosol [6]. L'intensité de l'aérosolisation (ex : vitesse à laquelle un liquide est projeté sur la paroi d'un nébuliseur), la concentration du milieu aérosolisé [7], l'humidité du milieu où se retrouve l'aérosol, sont tous des paramètres affectant sa grosseur et ainsi son parcours.

Les particules peuvent être influencées par diverses forces tels que l'inertie, la sédimentation, la diffusion, l'interception et l'attraction électrostatique [3]. La figure 3 présente tous ces mécanismes. En A, l'impaction par inertie est illustrée. Plus une particule a un gros diamètre, plus il est difficile de la faire dévier de sa trajectoire initiale, et donc d'éviter les obstacles. Dans le cas de la sédimentation (Figure 3B), les particules sont tirées vers le bas par l'attraction gravitationnelle et finissent par se déposer sur une surface. Les particules de plus de 1 µm sont particulièrement influencées par ce mécanisme [3]. Le mécanisme d'interception (Figure 3C) est en jeu lorsqu'une particule est assez légère pour suivre le courant d'air, mais qui en raison de sa forme elle va entrer en contact avec une surface et s'y déposer. Par exemple, les fibres d'amiante (voir figure 4) qui malgré un faible d_a, peuvent facilement s'accrocher aux obstacles en raison de leur forme fine et longue. Les particules de petit diamètre, soit moins de 0,5 µm, obéissent au mécanisme de diffusion (Figure 3D). Les particules sont en constante agitation en raison du mouvement brownien, plus précisément en raison de la collision continuelle avec les molécules de gaz qui entourent la particule. En s'agitant ainsi, la particule augmente ses chances d'entrer en collision avec une surface. Finalement, l'attraction électrostatique (Figure 3E), est la déposition d'une particule chargée sur une surface de charge opposée. La particule peut aussi être entraînée vers une surface par répulsion de charges identiques.

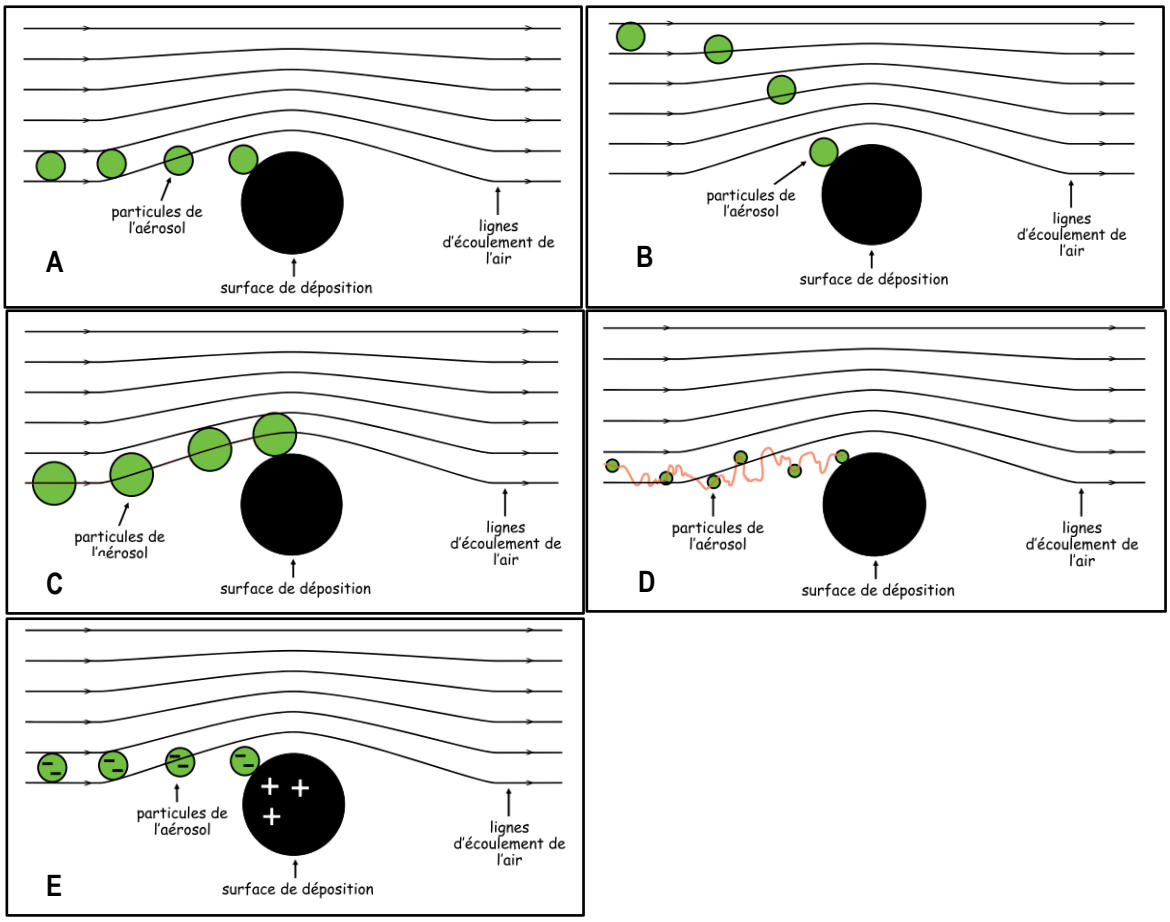


Figure 3: Schématisation du comportement des particules dans l'air. A) Impaction par inertie, B) sédimentation, C) interception, D) diffusion et E) attraction électrostatique. Figure adaptée de [3].

1.1.4 Les bioaérosols

Les bioaérosols sont aussi des particules en suspension, mais composées de matériels biologiques. Par exemple, ils sont composés de microorganismes entiers, morts ou vivants, de leurs fragments (toxines, protéines ou acides nucléiques), de fragments d'autres organismes (animaux et plantes), de composés chimiques et de minéraux.

Étant de très petite taille, les bioaérosols peuvent rester en suspension dans l'air pour de longues périodes de temps et parcourir de longues distances en

fonction des courants d'air [3]. Il existe des exemples où il semble évident que la transmission d'infections ce soit faite sur plusieurs mètres, voire des kilomètres (voir section 1.2.3.2). Leur petite taille leur permet aussi de pénétrer facilement les voies respiratoires [8]. Étant donné leurs caractéristiques, les bioaérosols peuvent être de puissants vecteurs de transmission de pathogènes.

1.1.5 Les virus

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires. Ils ne peuvent pas se multiplier à l'extérieur d'une cellule, car ils ne possèdent pas d'enzymes leur permettant de produire de l'énergie. Ils empruntent donc celles de leur hôte en détournant le métabolisme de la cellule vers la synthèse de composantes virales [9]. Les virus sont constitués d'acides nucléiques, ADN ou ARN, entourés d'une capside protéique et sont parfois enveloppés d'une membrane. Ils sont généralement très petits (20 à 300 nm), quoiqu'on ait découvert le Mimivirus qui mesure 400 nm [9].

Parmi les caractéristiques essentielles pour qu'un virus provoque une infection chez l'homme il y a : la capacité de se transmettre efficacement dans l'environnement, avoir une ou plusieurs portes d'entrée chez l'homme, être capable de s'attacher à une cellule et de se multiplier, pouvoir être excrété dans l'environnement et finalement être capable de développer des mécanismes alternatifs face au système immunitaire [10].

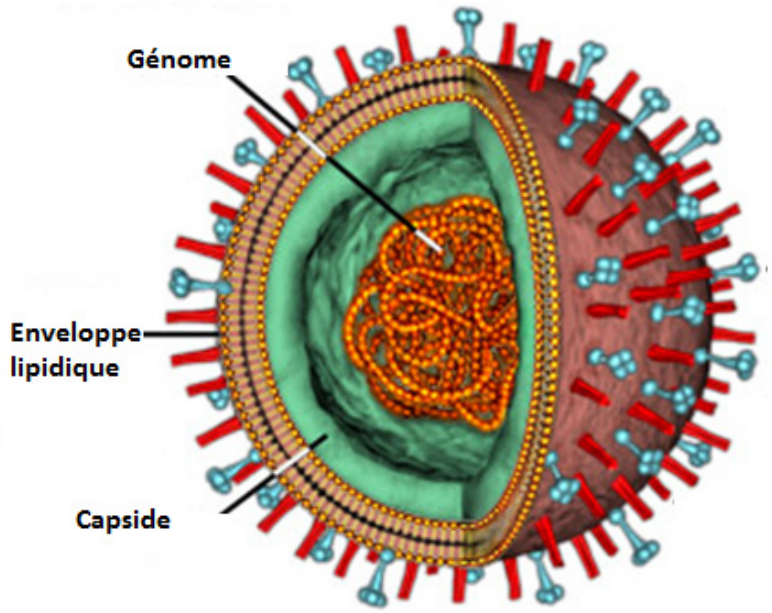


Figure 4: Virus de l'*Influenza*. Les trois composantes principales d'un virus de l'*Influenza* sont représentées: le génome, la capside et l'enveloppe lipidique. Source : http://www.medliorate.com

Plusieurs virus peuvent facilement se retrouver dans l'environnement. Dans le cas des virus respiratoires, par exemple, ils sont relargués en toussant, en éternuant, en parlant ou simplement en respirant. Les gens infectés par des virus entériques ont quant à eux des épisodes très aigus de diarrhées et de vomissements, souvent sous forme de jet, qui mènent à une production de bioaérosols chargés de virus. Il a même été estimé que plus de 30 millions de virus peuvent être libérés pendant un vomissement [11].

1.1.6 L'aérovirologie

L'aérovirologie est un domaine qui consiste à étudier le comportement des virus dans l'air, que ce soit leur transport, leur survie, leur concentration ou leur diversité. Si cette science en est encore à ses débuts, c'est que l'étude de la transmission aérienne des virus ou des bactéries est très ardue. En effet, les microorganismes et les virus se retrouvant dans l'air subissent un très grand stress (température, humidité, UV) pouvant affecter leur infectivité. Ils sont aussi très dilués, rendant leur détection difficile par des techniques de culture dont la

sensibilité n'est pas assez élevée. De plus, l'échantillonnage étant inévitable, un stress supplémentaire est imposé aux virus capturés ce qui rend encore plus difficile leur étude.

Il n'existe toujours pas de méthodes standardisées pour la collecte d'aérosols viraux, rendant la comparaison des études ardue. La méconnaissance de la distribution aérodynamique des virus dans l'air (taille des particules qui transportent les virus) nuit à la mise au point de méthodes standardisées. Il est primordial d'approfondir nos connaissances dans le domaine de l'aérovirologie et de mieux caractériser les environnements susceptibles d'être fortement contaminés.

1.1.7 Les chambres de génération

L'étude des aérosols dans leur environnement naturel peut être riche d'informations, mais les confiner dans un environnement contrôlé permet d'arriver à des conclusions plus solides, sachant à quoi ils ont été réellement exposés. Pour se faire, on confine les aérosols dans des chambres de génération. On entend par chambre de génération, une enceinte dans laquelle des aérosols peuvent être produits, confinés et étudiés [3]. Ces chambres sont très souvent faites sur mesure pour répondre spécifiquement aux besoins des laboratoires. Dans leur fabrication, plusieurs éléments doivent être pris en considération. On peut entre autres citer le matériau de la chambre qui doit être exempt d'électricité statique pour empêcher les particules de s'y coller. Ainsi, le plastique est à proscrire et l'acier inoxydable est souvent le meilleur choix. La tubulure connectée aux chambres doit aussi être sans électricité statique, et on privilégie une tubulure courte à plus gros diamètre qui diminue les pertes de particules lors de l'échantillonnage. Il y a deux types de chambre de génération : statique et dynamique [12].

1.1.7.1 Les chambres statiques

Dans les chambres statiques, une fois les aérosols produits, il n'y a plus aucun mouvement de l'air. Dans ce type de chambre, les particules sont soumises à la force gravitationnelle, à la force électrostatique et au processus de diffusion, qui vont entraîner une diminution du nombre de particules. Ceci a pour désavantage la perte des particules et ainsi empêcher l'étude d'effets à long terme sur les aérosols. Cependant, la conception de ce genre de chambre est très simple, ce qui offre un avantage considérable [3].

Dans les chambres statiques, on peut faire l'étude de l'efficacité d'échantillonneurs, de filtres et la perte d'aérosols sur les parois de différents matériaux par exemple [3]. Ce genre d'études peut aussi être fait dans les chambres dynamiques.

1.1.7.2 Les chambres rotatives

Dans les chambres de génération dynamique, l'air est continuellement en mouvement. Le mouvement de l'air peut être généré par des ventilateurs à l'intérieur de la chambre, par des courants de convection dus à la chaleur, par un apport continuel d'aérosols ou par la rotation de la chambre autour d'un axe horizontal. La figure 5 présente différents modèles de chambres dynamiques.

C'est Goldberg, en 1958, qui fut le premier à mettre au point une chambre environnementale rotative, plus communément appelée *rotating drum* dans la littérature, voir figure en annexe [2]. Les études faites avant 1958 ne pouvaient pas caractériser l'effet de différents facteurs environnementaux, ou simplement l'effet du temps, sur l'intégrité des particules en suspension.

En effet, sous l'effet de la force gravitationnelle, les particules nébulisées dans une chambre statique peuvent se déposer très rapidement et ainsi empêcher leur récolte. Cependant, pour réellement caractériser l'effet de différents facteurs sur les aérosols, ils doivent avoir été en contact avec cette condition pendant un certain laps de temps.

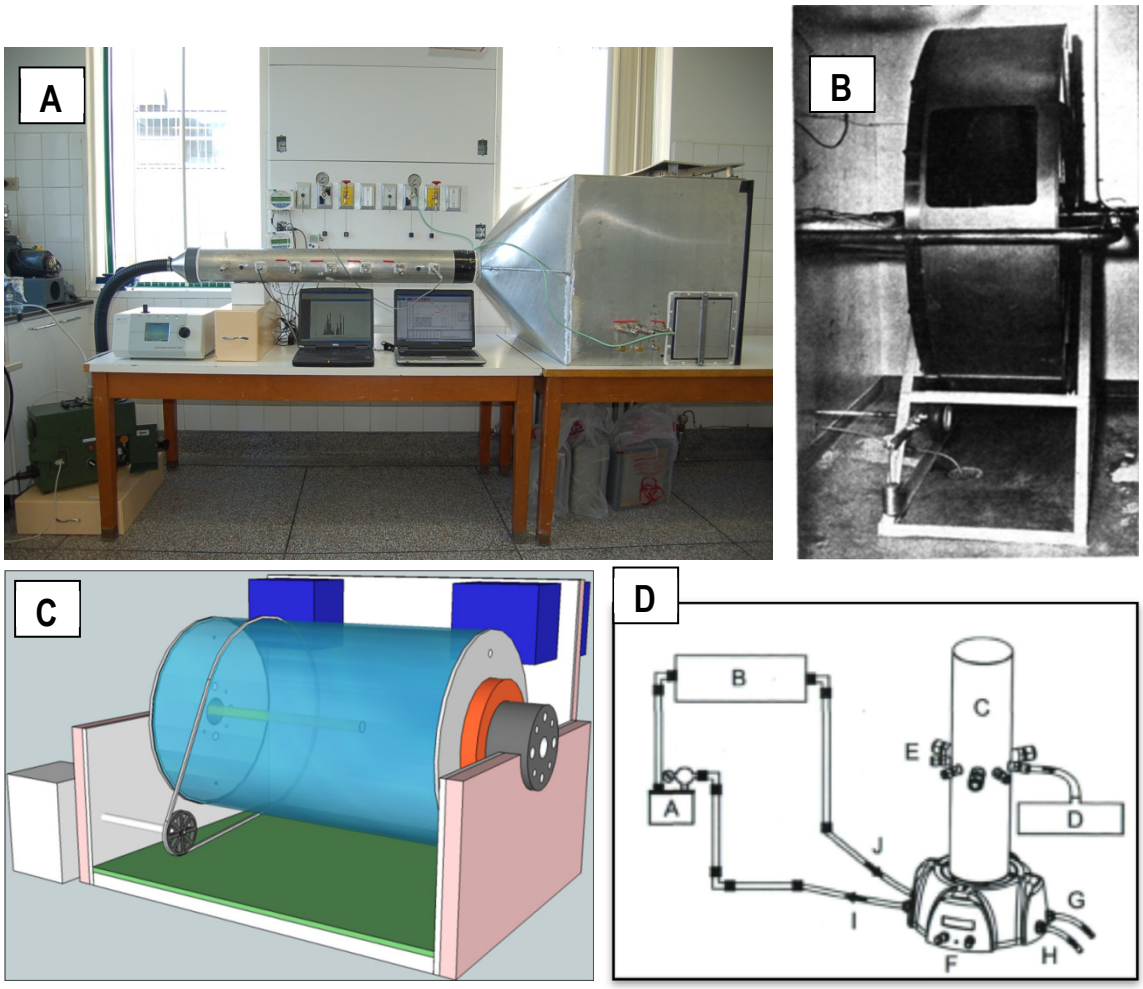


Figure 5: **Différents types de chambres dynamiques**. A) tunnel de vent, B) première chambre rotative (figure modifiée de [2], C) chambre rotative moderne, D) chambre dynamique "Genamini" faite sur mesure pour l'évaluation des performances de différents échantillonneurs.

Lorsque la rotation est ajoutée, il se produit une compétition entre les forces gravitationnelle et centrifuge [13]. Cependant, la vitesse de rotation ne doit pas être trop élevée, autrement les particules en suspension se déposeront sur les parois de la chambre par inertie [14]. Les vitesses de rotation suggérées se trouvent entre 0 et 10 rpm. La trajectoire des particules à l'intérieur d'une chambre rotative suit une spirale qui dérive lentement vers l'extérieur en fonction du temps (Figure 6) :

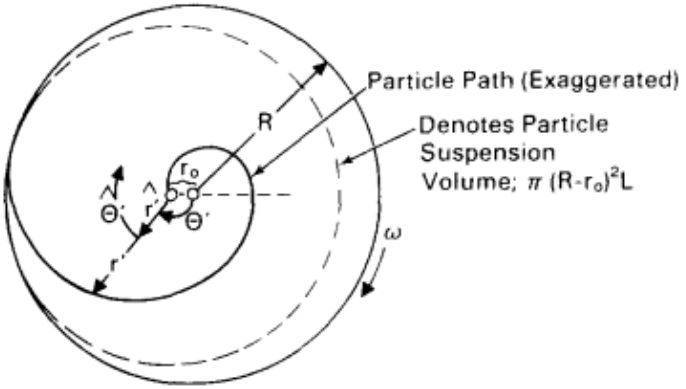


Figure 6: Trajectoire des particules à l'intérieur d'une chambre rotative. Lorsque la rotation est ajoutée, les particules sont soumises aux forces centrifuge et gravitationnelle, leur donnant une trajectoire en spirale dérivant lentement vers la périphérie [13]. Figure tirée de [13].

Selon les travaux d'Asgharian *et al.*, avec une faible vitesse de rotation il serait possible de garder en suspension des particules de moins de 1 µm pendant un an. Dans les mêmes conditions, 50% des particules de 1 à 2 µm restent en suspension pour une période de 6 mois [13].

La figure 7, toujours tirée des travaux d'Asgharian *et al.*, démontre que plus le diamètre des particules est élevé, moins elles restent en suspension longtemps. Elle met aussi en évidence le rôle de la rotation dans le maintien en suspension des particules, car en absence de rotation, les particules de 0,5 µm sédimentent en moins de 2 jours.

On mentionne aussi que pour maintenir en suspension les particules de gros diamètre, plus de 20 µm, il faut une vitesse de rotation très faible, soit environ 0,4 rpm. Il existe donc une relation inversement proportionnelle entre le diamètre des particules ciblées et la vitesse de rotation. Il existe la même relation entre le temps de séjour dans la chambre rotative et la vitesse de rotation [13].

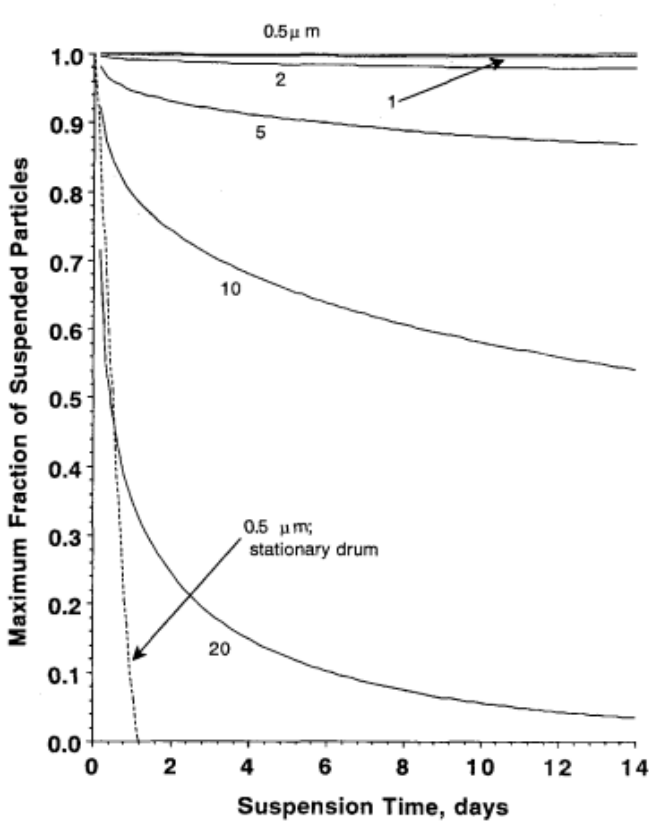


Figure 7: Fraction du nombre initial de particules en fonction du temps selon la grosseur des particules qui reste en suspension dans la chambre rotative. La ligne hachurée représente le comportement des particules de 0,5 µm en absence de rotation, démontrant le grand rôle de la rotation [10]. Figure tirée de [10].

Avec l'apparition des chambres environnementales rotatives, plusieurs autres équipes ont utilisé cette technologie pour l'étude des aérosols. On a entre autres fait des expériences sur les virus suivants : Food-and-Mouth virus (FMDV) [15, 16], Colombia SK Group virus [17], Rotavirus [18, 19], bactériophages S-13, MS2 [20] et T3 [21], Adenovirus [22], Poliovirus [18], NDV (Newcastle Disease Virus), IBR (rhinotrachéite infectieuse bovine) et VSV (Vesicular stomatitis Virus) [21]. Dans la plupart de ces expériences, on a utilisé un appareil de type Collison (voir section 1.1.7.3) pour la nébulisation de virus à l'intérieur de la chambre, on a échantillonné avec un *all-glass impinger* AGI-30 et fait des tests d'infectivité. Le liquide de nébulisation et d'échantillonnage était souvent le milieu de culture additionné d'anti-mousse.

1.1.7.3 Les nébuliseurs

Le nébuliseur le plus populaire pour l'étude des aérosols viraux est le Collison [23]. Les aérosols sont produits par un jet d'air chargé de liquide, orienté perpendiculairement aux parois du contenant. Les plus grosses gouttelettes vont s'impacter sur la paroi tandis que les aérosols suivent le flot d'air. Ce nébuliseur produit une grande quantité de particules de moins de 1 µM et suivant une distribution normale, tel qu'illustré sur la figure 8. La constance dans le nombre et la taille des particules est un avantage majeur du Collison, car cela empêche qu'il y ait trop de variabilité dans les résultats. En effet, si dans une expérience les particules sont beaucoup plus grosses que dans une autre, les conditions environnementales peuvent avoir moins d'impact sur les virus. Un type de nébuliseur qui offre une distribution très variable de particules est le *bubbling aerosol disperser [3].* Il crée des aérosols par éclatement de bulles à la surface du liquide, et donc la grosseur et la quantité de bulles formées sont très variables.

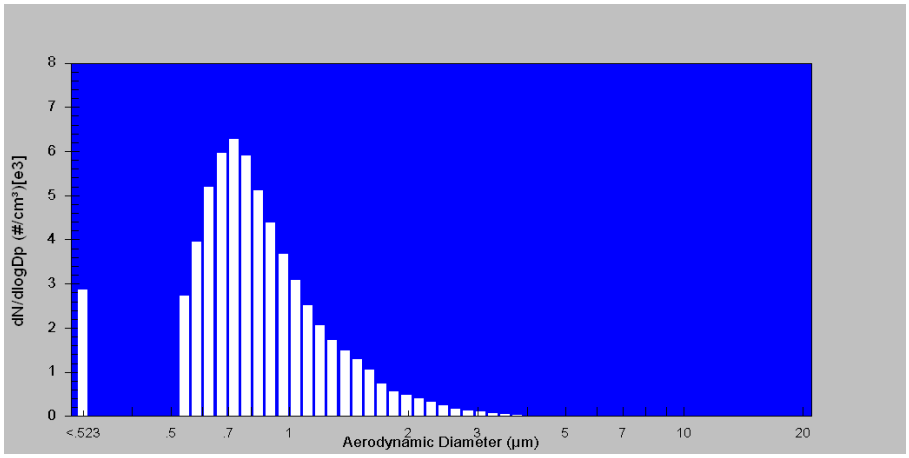


Figure 8: Distribution des particules produites par le Collison selon leur diamètre aérodynamique (µm). Le diamètre moyen des particules était d'environ 0,8 µm et la chambre contenait environ 10^5 particules/cm^3 après 10 minutes de nébulisation. L'appareil n'est pas en mesure de mesurer les particules de moins de 0,5µm de diamètre aérodynamique.

1.2 La transmission virale

1.2.1 Évolution des croyances

Il est mentionné plus haut que la transmission des maladies via les aérosols est un phénomène encore mal compris, mais comparativement aux croyances d'antan, nous avons fait des avancées considérables.

Bien avant Jésus-Christ, il était connu que la maladie pouvait se rependre à grande vitesse au sein d'une population. Les causes de ces épidémies étaient inconnues, mais les savants de l'époque avaient tout de même une théorie : les miasmes. Ce terme vient de *miasma* qui signifie pollution en grec. En effet, on croyait que les maladies se transmettaient par le biais de vapeurs ou nuages nocturnes nauséabonds. Ces vapeurs émanaient souvent des marais ou des sols nocturnes (emplacement où les habitants jetaient leurs déchets et déjections) [24]. On incrimina donc les odeurs nauséabondes pour plusieurs maladies dont les trois grandes épidémies de peste, ainsi que pour plusieurs épidémies de choléra. Pour s'en protéger, on pouvait porter un mouchoir imbibé de vinaigre et d'épices, coupant les mauvaises odeurs. Les gens de l'époque sont même allés jusqu'à vider des marais. John Snow (1815-1858) est l'un des pionniers à avoir mis en doute cette théorie depuis longtemps établie avec ses travaux sur le choléra [25]

Les travaux de Louis Pasteur (1822-1895), scientifique français, mirent en lumière l'omniprésence des germes dans l'air ambiant. En effet, il démontra à l'aide d'un ballon à col de cygne et d'un autre muni d'une ouverture standard, qu'aucune croissance n'apparaissait dans le premier en raison de l'incapacité des particules de l'air à remonter le col. La théorie des germes était maintenant la préférée [3].

Par la suite, et aujourd'hui encore, la théorie des gouttelettes, particules chargées de pathogènes produites lors de la toux ou éternuement pouvant parcourir 1 à 2 mètres, est très présente [8]. C'est d'ailleurs sur cette théorie que se basent les pratiques sanitaires dans le contrôle et la prévention des infections. Les noyaux de gouttelettes quant à eux, pouvant parcourir de plus grandes distances, ne sont pris en considération dans les mesures sanitaires que pour les maladies où il a été prouvé hors de tous doutes qu'ils sont responsables de la transmission, soit pour la tuberculose, la rubéole et la varicelle [8]. Pourtant, leur pouvoir de transmission pourrait être grandement sous-estimé.

1.2.2 Généralités

On considère qu'il existe trois voies de transmission des virus: le contact direct avec une personne infectée ou le contact indirect via des surfaces contaminées, l'exposition à des gouttelettes lors de toux ou d'éternuement et l'inhalation d'aérosols. On peut aussi nommer ces deux derniers modes de transmission : transmission courte distance et transmission longue distance. On mentionne dans la section 1.1.3 la différence entre gouttelette et noyau de gouttelette (aérosol). La capacité de différencier ces types de particules permet d'établir le mode de transmission d'une maladie et ainsi établir des mesures de protection adéquates. Pour la plupart des pathogènes respiratoires, la contribution relative de chacune de ces voies de transmission n'a pas été clairement établie [26, 27].

Chaque année, des virus tels que l'*Influenza*, le virus respiratoire syncytial (VRS), le coronavirus causant le syndrome respiratoire aigu sévère (SARS), causent des épidémies à travers le monde. À elle seule, la grippe (*Influenza*) coûte de 71 à 167 millions par année aux États-Unis et cause de 250 000 à 500 000 décès par année à travers le monde[1]. Toujours aux États-Unis, plus de 1,5 million

[1] http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/

d'enfants infectés par le VRS sont admis à l'hôpital chaque année (OMS). Les aérosols pourraient largement contribuer à la propagation de ces infections.

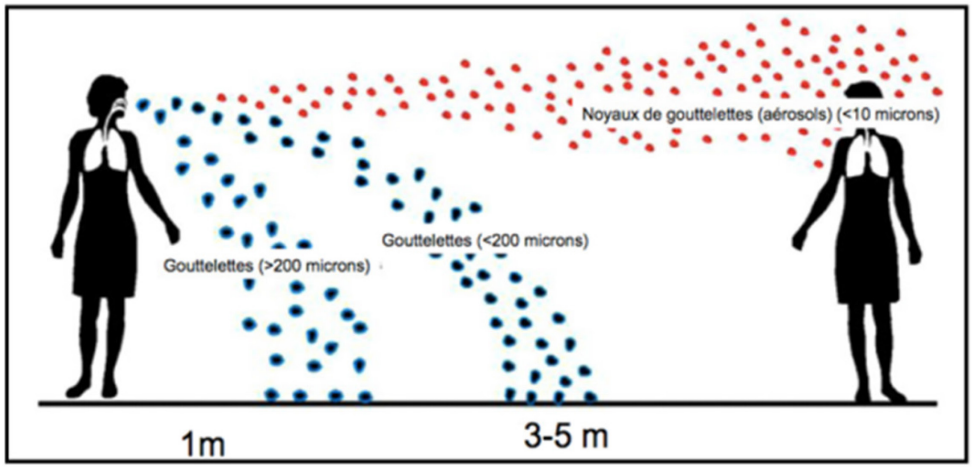


Figure 9: Transmission courte et longue distance. Les gouttelettes produites lors de la toux, par exemple, sont responsables de la transmission courte distance (jusqu'à 5 mètres). Les noyaux de gouttelettes, par leur petit diamètre aérodynamique, vont pouvoir rester en suspension plus longtemps et parcourir de longues distances. On parle alors de transmission longue distance. Figure tirée de [3].

L'incidence des infections nosocomiales est aussi à mentionner. Dans les hôpitaux canadiens, un patient sur neuf contracte une infection associée aux soins de santé. Ces infections sont la quatrième cause de mortalité au pays [28]. Il a été estimé que 10 à 33% de ces infections seraient transmis via les aérosols [29].

Finalement, on sait depuis longtemps qu'un grand nombre d'infections sont d'origine virale (estimation à 60% en 1965 [30]), et puisque les virus se répliquent à l'intérieur des cellules de l'hôte, on peut difficilement les combattre sans affecter le patient. Il existe tout de même des antiviraux qui peuvent affecter le cycle de réplication des virus. On peut s'en protéger par la vaccination, mais la création d'un vaccin est ardue, particulièrement pour les virus à ARN qui mutent rapidement [31] Bref, la protection de la population repose grandement sur des mesures préventives et de protection qui ne sont adéquates que si nous avons une bonne compréhension des mécanismes de transmission.

1.2.3 Transmission via les aérosols

1.2.3.1 Généralités

On parle de transmission via les aérosols lorsque les gouttelettes chargées de pathogènes, formées par différents mécanismes, sont suffisamment petites pour rester en suspension pour une période prolongée et parcourir de longues distances [32]. Par exemple, on estime que des particules d'un diamètre de 1-3 µm peuvent rester en suspension presque indéfiniment. Les particules de 10 µm, 20 µm et 100 µm prennent 17 minutes, 4 minutes et 10 secondes respectivement pour sédimenter d'une hauteur de 3 mètres [33]. Ces aérosols infectieux peuvent être produits entre autres par : la toux, l'éternuement, la respiration, les vomissements, des épisodes aigus de diarrhée ou la remise en suspension de virus déposée sur des surfaces via les gouttelettes (marche, mouvement des vêtements, entretien ménagé, changement des draps de lit, etc.)

On détient peu d'information sur la quantité de virus que peut excréter une personne infectée ainsi que sur le diamètre des particules produites (Lindsley, Pearce *et al.* 2012). Ceci est en partie dû au manque d'instruments de mesure ainsi qu'à la grande variation entre les études. Cette variation peut être due aux différences dans le taux d'humidité et la température du laboratoire, dans la vitesse du vent et aux différences interindividu [34]. On approxime toutefois que la toux peut produire environ 3000 noyaux de gouttelettes, tout comme parler pendant 5 minutes [35], et qu'un éternuement produit plus de 40 000 particules qui en s'évaporant au contact de l'atmosphère ont un diamètre de 0,5 à 12 µm [36]. Des études ont aussi démontré la présence de virus dans l'air expiré par des patients [37, 38]. On mentionne aussi que la toux excrète des organismes qui se développent dans les voies respiratoires inférieures et que l'éternuement et la parole expulsent des organismes des voies supérieures [39]. La figure 9 permet de bien visualiser la grosseur des particules produites, selon le mécanisme de

production, ainsi que l'endroit de déposition dans les poumons en fonction du diamètre de la particule.

Une fois dans l'air ambiant, les aérosols entrent en contact avec la muqueuse oro-nasale et sont susceptibles de causer une infection [40]. Il a aussi été prouvé que le virus de l'*Influenza* peut se transmettre via la muqueuse des yeux [41]. La mise en place de l'infection va aussi dépendre de la stabilité du virus, de sa résistance aux différentes températures, à la dessiccation et aux radiations, de la quantité de virus qui peut être expulsée du véhicule de transmission et de la virulence de celui-ci [10]. La variabilité de la réponse du système immunitaire de chaque individu, dépendant de son historique d'exposition à différents pathogènes, est un autre facteur influençant l'établissement d'une infection [10].

Il est important de mentionner la difficulté de prouver qu'un virus peut se transmettre via les aérosols. Contrairement à la transmission via des surfaces contaminées, par exemple, où l'on peut échantillonner à l'aide d'un écouvillon une partie de la surface où a pu se déposer du mucus chargé de pathogène, l'étude des aérosols est plus ardue. En effet, une fois émis hors de l'hôte, les virus se diluent dans l'air ambiant rendant leur détection difficile, d'autant plus que les méthodes de détection par cultures ne sont souvent pas assez sensibles et que les échantillonneurs ont souvent des effets néfastes sur l'intégrité des virus [3].

Avec le développement des technologies en biologie moléculaire, beaucoup d'équipes se sont tournées vers ces méthodes pour l'analyse des aérosols. Plusieurs études ont démontré l'efficacité de la qPCR dans la détection des virus dans l'air [42-45] [46] [47-50]. Cette technique est beaucoup plus sensible que les méthodes traditionnelles d'échantillonnage et permet la détection de virus même si leur concentration est très faible. Elle permet aussi de savoir rapidement si un environnement est contaminé contrairement à la culture qui peut prendre des jours voire des semaines. Cette méthode permet d'échantillonner un très grand volume d'air, puisque notre échantillon est très dilué dans l'air, sans réellement se soucier

des dommages causés par ces techniques sur la structure du virus. Le principal est d'avoir de l'ADN ou ARN intact. Ceci est prometteur, car on ne peut pas, à coup sûr, se fier au pourcentage d'infectivité d'un virus dans l'étude des aérosols. En effet, les méthodes actuelles d'échantillonnage endommagent les virus, amenant très probablement de faux négatifs. La qPCR, quant à elle, permet de déterminer s'il y a présence du virus en question. Cependant, il reste difficile d'affirmer que la présence d'ADN ou d'ARN soit associée à un risque d'infection. Il se pourrait que tous les virus soient non infectieux. Cette question découle directement du manque d'information quant à la propagation et la survie des virus dans l'air et du manque de méthodes d'échantillonnage douces et conservant l'infectivité des virus échantillonnés.

Les connaissances sur la transmission des virus via les aérosols s'accumulent, mais les études sont difficilement comparables entre elles en raison de la divergence de techniques utilisées ou les différences dans la présentation des résultats d'un laboratoire à l'autre [23]. Ce manque de standardisation entre les études empêche de voir s'il est possible de tirer des conclusions pour l'ensemble des familles de virus. En effet, le changement d'une seule variable, par exemple le liquide de nébulisation, dans des conditions aussi stressantes que la nébulisation et l'échantillonnage peut amener des résultats forts divergents d'une équipe à l'autre.

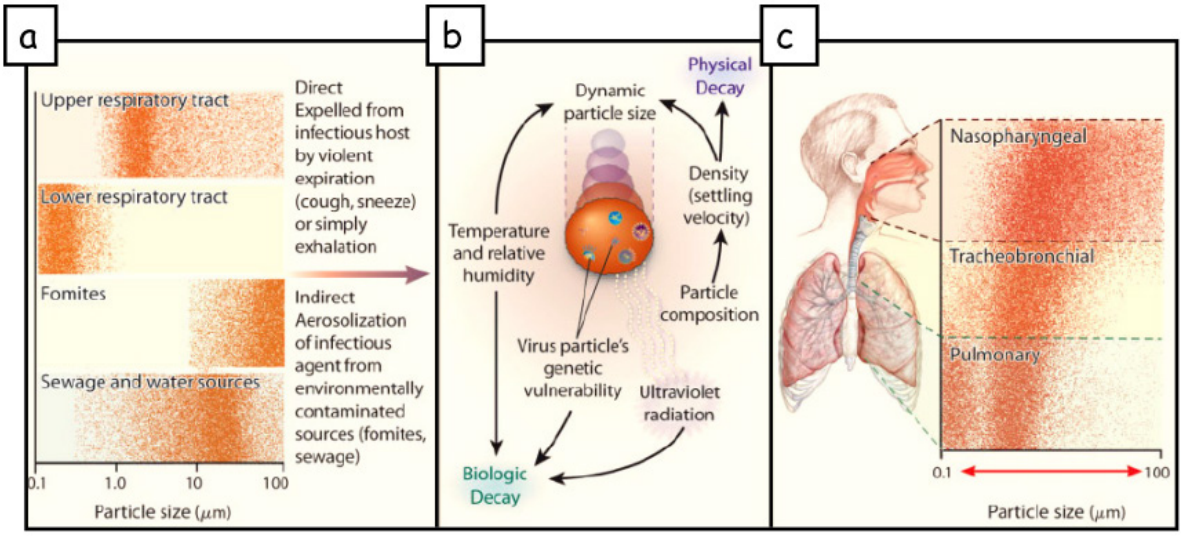


Figure 10: Parcours aérobiologique des maladies transmissibles pas l'air. En A on voit la grosseur de particules produites selon différents mécanismes. En B les différents facteurs qui peuvent avoir un impact sur la grosseur d'une particule ainsi que sur l'intégrité des virus qui la compose sont présentés. Finalement en C, on voit l'endroit de déposition des particules dans le poumon, selon leur diamètre [8]. Figure tirée de [8].

1.2.3.2 Cas possibles de transmission par l'air

Malgré la difficulté de prouver la transmission via les aérosols, plusieurs cas de transmission de maladies nous laissent croire que ce mode est bel et bien présent et qu'il devrait être pris en considération dans les mesures de protection.

On peut, entre autres, citer la pandémie de SARS-CV qui a sévèrement touché Hong-Kong en 2003. Il s'agit d'un évènement où l'on soupçonne fortement les bioaérosols comme véhicule de transmission. En effet, le cas numéro un aurait évacué des fèces et de l'urine contaminées par ce coronavirus puis, les conduits de drainage étant mal scellés, des bioaérosols ont pu s'en échapper et se retrouver dans les conduits de ventilation. L'air contaminé est sorti sur le toit de l'édifice à logement et, grâce aux vents dominants, a contaminé des édifices à plus de 60 mètres de distance [26]. Ce patient numéro un s'est rendu à l'urgence d'un hôpital et 41% des patients qui ont attendu dans la même salle ont été contaminés

au SARS. Il a aussi été démontré que la distance entre le lit de ce patient un et les autres était inversement proportionnelle au risque d'infection. En effet, le 2/3 des patients de la même salle ont été infectés, la moitié des patients de la salle adjacente et 18% des patients d'une salle plus loin [51].

La fièvre aphteuse (FMDV) peut aussi se transmettre via les aérosols lorsque les conditions environnementales et épidémiologiques y sont propices. On rapporte un cas en Angleterre, en 1967, où en trois semaines le virus s'est disséminé d'une ferme vers 300 autres, dont certaines étaient situées à plus de 60 km [52].

Un article de Moser, largement cité, détaille une épidémie d'*Influenza* qui a eu lieu à bord d'un avion en Alaska. L'avion en question faisait plusieurs arrêts où des passagers descendaient et montaient. À bord, une personne démontrait des symptômes grippaux. Au cours du trajet, l'avion a eu des problèmes mécaniques et a dû rester au sol 3 heures avec les passagers à bord, sans ventilation. En 72 heures, 72 % des passagers ont eu des signes d'infection à l'*Influenza*. Les probabilités d'être malade étaient proportionnelles au temps resté à bord et aucune personne descendue avant l'arrêt de la ventilation n'est tombée malade. Ceci démontre le rôle de la ventilation dans le contrôle des infections [53].

Il existe aussi des cas avec des virus entériques [54]. Norovirus peut facilement se retrouver dans l'air sous forme d'aérosol tel que mentionné plus haut. Sous cette forme, le virus peut être inhalé et ensuite avalé.

Sawyer *et al.* ont étudié une épidémie de gastroentérite dans un hôpital de Toronto. Ils ont conclu que la transmission aérienne du virus a joué un grand rôle en raison du très grand pourcentage de personnes infectées (33%) qui se sont retrouvées à l'urgence en même temps que le cas numéro 1 et de l'augmentation du pourcentage de malades en fonction du temps passé à l'urgences [54].

Kimura *et* al. ont étudié une épidémie de gastroentérite dans un hôtel. Une femme a vomi dans un couloir de l'étage 25 et de nombreux participants à un mariage se déroulant sur le même étage ont rapporté des symptômes de gastroentérite. La nourriture ne semble pas en cause, car tous les étages ont mangé de la nourriture des mêmes cuisines. De plus, on a retrouvé par écouvillonnage de surface du virus à des endroits qui ne peuvent avoir été touchés [55].

Une autre étude de Marks *et* al. sur une épidémie de gastroentérite qui a éclaté dans un hôtel-restaurant suggère fortement que les aérosols en sont également responsables. Pendant le repas, une femme a vomi. Les dégâts ont été rapidement ramassés, mais 24 à 48 heures plus tard, de nombreux clients ont rapporté des symptômes de gastroentérite. En analysant la position des malades durant le souper, on a démontré que la probabilité d'être malade était inversement proportionnelle à la distance de la table où a eu lieu l'incident. Finalement, toutes les autres salles à manger n'ont rapporté aucun cas de gastroentérite, et toute la nourriture a été préparée ensemble [11].

1.2.3.3 Effet de différents facteurs sur la persistance des virus dans l'air

Tel que mentionné plus haut, les virus qui se retrouvent en suspension dans l'air sont affectés par les conditions environnementales. Voici un aperçu de l'effet de ces conditions.

Effet de l'humidité

L'humidité de l'air est l'un des plus importants facteurs affectant la persistance de virus infectieux dans l'air. On affirme que les virus enveloppés sont plus résistants à bas pourcentage d'humidité (20-30%) [56]. Parmi les virus enveloppés on retrouve plusieurs virus respiratoires tel que l'*Influenza*, *Coronavirus*, VRS, *Parainfluenza*, etc. il existe cependant des exceptions. Le virus

du sarcome de Rous (VSR) et le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (VRIB), tous deux enveloppés, résistent mieux à de hauts taux d'humidités, et le virus de la variole du pigeon serait insensible aux modulations d'humidité [56].

Parmi les virus non enveloppés, les *Rhinovirus* et *Adenovirus* par exemple, des pourcentages d'humidité de 70 à 90% seraient plus favorables à leur résistance [57]. Arundel *et al.* ont découvert que pour ces virus, des pourcentages moyens d'humidité de 40 à 70% étaient les plus néfastes [58]. Dans un graphique du pourcentage d'infectivité en fonction du pourcentage d'humidité, on observerait donc une courbe en forme de V (figure 11). On peut expliquer ces résultats par le fait qu'à un haut niveau d'humidité relative, la quantité d'eau dans l'aérosol est plus grande, donc la concentration de sel est faible et l'activité de l'eau grande. Ces deux conditions seraient favorables à leur persistance. À moyenne humidité relative, la concentration de sel est plus grande et l'activité de l'eau plus faible, donc plus stressant pour les virus. La persistance de certains virus à un faible taux d'humidité pourrait être expliquée par le fait que dans ces conditions les sels sont sous forme davantage solide et donc peu toxique pour les virus [59]. Il est à noter qu'une récente étude menée par Shaman et Kohn démontre que ce serait davantage l'humidité absolue qui aurait un réel impact sur la viabilité du virus [60].

Donaldson et Ferris [61] proposent que la tension de surface puisse être responsable de la baisse d'infectivité des virus enveloppés. En effet, l'hydrophobicité des virus enveloppés ferait en sorte qu'ils se retrouveraient à la surface des aérosols et seraient soumis aux tensions de surface. Cette dernière pourrait provoquer des changements de conformation chez le virus. À de hautes humidités, la surface de l'aérosol est plus grande par la présence de plus de liquide, augmentant ainsi la tension et expliquant peut-être une plus faible stabilité [61].

Dans une récente revue de la littérature sur l'effet de l'humidité sur les aérosols viraux, il est proposé que ce serait davantage le pH qui jouerait un rôle dans l'inactivation des virus [62]. En effet, lors de l'évaporation des liquides d'un aérosol, la concentration des ions H^+ augmente, abaissant ainsi le pH. Cette baisse engendrerait des changements de conformation des glycoprotéines de la capside de certain virus, essentielles au processus d'infection. Si un virus passe par une étape d'acidification, dans l'endosome par exemple, pour infecter une cellule, de basses humidités vont induire un changement de conformation irréversible et empêcher l'infection. Les virus qui ne requièrent pas de changement de pH pour l'infection seraient moins affectés par l'humidité. En résumé, des virus affectés par de bas pH (ex : *Influenza* A, SARS et virus de l'encéphalite équine du Venezuela par exemple), sont affectés par des humidités de 50-90%. Les virus qui fusionnent à pH neutre (ex : VRS) seront plus stables à des humidités comprises en 50 et 90%, tandis que les virus pouvant entrer dans la cellule par plus d'un mécanisme ont tendance à être résistants à toutes humidités.

Effet de la température

La température joue un rôle particulièrement important. Elle peut affecter les protéines virales, par exemple les enzymes, et le génome (ADN, ARN) [63]. Harper *et al.* ont démontré que de basses températures (7-8°C) étaient optimales pour la persistance du virus de l'*Influenza* [64]. Ehrlich et Miller ont aussi obtenu les mêmes résultats pour le virus Venezuela Equine Encephalitis [65], ainsi que Zimmerman *et al.* pour le PRRSV [66] et Ijaz pour le coronavirus [67]. Ijaz suggère que de basses températures diminuent la fluidité de la membrane lipidique du coronavirus, ce qui réduirait l'accès aux facteurs d'inactivation [67]. Lowen *et al*. ont fait des expérimentations avec le virus de l'*Influenza* et des cobayes et en sont arrivés à la conclusion qu'aucune transmission de la grippe par les aérosols n'est possible à plus de 30°C [68].

Effet des rayons ultraviolets (UV)

Les UV sont aussi néfastes pour les virus, tout comme pour les bactéries. Sous l'effet de radiations non-ionisantes (UV solaires), la thymine et la cytosine peuvent former des dimères covalents. Un dimère consiste en deux bases adjacentes qui, sur le même brin d'ADN, forment une double liaison. Une double liaison covalente empêche l'ADN polymérase d'effectuer la réplication de l'ADN [69].

Walker et Ko, ont démontré que les *Adenovirus* sont très résistants aux UVC (254 nm), tout comme le phage MS2, mais que les *Coronavirus* sont beaucoup moins résistants [70, 71]. Des études faites avec *Serratia marcescens* ont démontré qu'un haut niveau d'humidité diminuait les effets des UV. Il est suggéré que dans ces conditions l'évaporation est moins grande et permet à l'aérosol de garder une fine couche d'eau à sa surface [71, 72]. La même relation a été remarquée avec le virus de la Vaccine exposé aux UVC à des humidités de 20, 60 et 80% ($P<0,0001$), en plus d'un effet protecteur d'un fluide respiratoire synthétique ($P=0,014$) [73].

Effet de la présence de matière organique

La présence de matériel organique (le sang, le mucus, la salive, les fèces, etc.) peut faire varier la persistance des virus, car ce matériel peut protéger ces derniers des conditions environnementales [63]. Il a été démontré que le virus de l'encéphalomyocardite (EMC), le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) et le rotavirus sont plus stables lorsqu'aérosolisés en présence de salive, de sécrétions nasales et matière fécale respectivement [74-76]. L'effet de la poussière sur la viabilité des virus n'a pas été testé à ce jour, au meilleur de notre connaissance. La co-aérosolisation de poussières et de virus pourrait amener un effet protecteur aux virus ou aussi faire en sorte qu'ils sont moins longtemps en suspension dans l'air. En effet, les virus ont une tendance naturelle à s'agréger aux autres particules et restent ainsi moins longtemps en suspension [7]. Cet

aspect pourrait ne pas avoir d'impact sur la persistance des virus, mais est tout de même important pour la santé humaine et animale. En effet, si un virus ne se retrouve pas dans l'air que nous respirons parce qu'il s'est déposé sur une quelconque surface, nous avons moins de chance de le respirer.

Effet de l'échantillonnage

Les méthodes d'échantillonnage sont aussi à considérer avec beaucoup d'attention. Elles peuvent être très dommageables pour l'intégrité des virus et fortement affecter l'infectivité. Si on ne fait pas attention, on peut se retrouver avec de faux négatifs quant à la présence de virus, et penser qu'on se trouve dans un environnement sécuritaire, alors que c'est le contraire. Plusieurs études ont été menées quant aux meilleurs échantillonneurs à utiliser (une des étapes préliminaires du présent projet avait justement ce but), mais il en ressort très souvent que cela dépend de ce qu'on veut faire de notre échantillon.

Les filtres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) sont très efficaces pour trapper une très grande quantité de virus et ce nombre augmente en fonction du temps. Ceci est un avantage comparativement au Biosampler® (impacteur liquide) qui n'est efficace que pour un temps échantillonnage de moins de 30 minutes en raison de l'évaporation du liquide [77]. Duchaine et *al.* ont démontré que les filtres de polycarbonate étaient plus appropriés lorsqu'on veut récolter ce qui se trouve sur le filtre. En effet, en raison de leur structure, les filtres de PTFE endommagent beaucoup plus les virus et les gardent piégés dans les fibres [78].

Les filtres de gélatine sont souvent efficaces pour récolter des particules virales [79], mais leur composition pose souvent problème. En effet, ils ne résistent pas bien aux échantillonnages prolongés, car ils se dessèchent et se brisent, affectant l'efficacité de récolte des virus. Ces filtres peuvent aussi se liquéfier lorsque l'humidité est trop élevée [80]. Ils peuvent aussi interférer avec la réaction de PCR [81].

Le *NIOSH 2 stage cyclone aerosol sampler* est un échantillonneur qui semble plus approprié pour l'échantillonnage de virus. Le premier étage collecte les particules de taille supérieure à 1,8 µm, le deuxième étage entre 1-1,8 µm et le filtre récolte les particules submicroniques. La plupart des particules virales se retrouvent dans le tube 2 et sur le filtre, mais cela dépend de l'environnement échantillonné. La quantité de particules récoltées augmente avec le temps d'échantillonnage [81]. Le *NIOSH 2 stage cyclone aerosol sampler* est un échantillonneur très intéressant pour la détection de virus par biologie moléculaire (qPCR). En effet, il a été possible de détecter de l'*Influenza* dans les urgences d'hôpital à l'aide de cet échantillonneur [43]. Cependant, pour l'étude de l'infectivité des virus, c'est un appareil plus stressant qu'un impacteur liquide (Nathalie Turgeon, résultats non publiés).

Les impacteurs liquides du genre AGI (*All-Glass-impinger*) sont souvent utilisés dans l'étude des aérosols viraux. Les grosses particules sont impactées dans le liquide, tandis que la formation de bulles aide à trapper les plus petites particules par diffusion. Ces bulles peuvent aussi avoir le désavantage de ré-aérosoliser les particules, en particulier celles qui sont hydrophobes. Les échantillonneurs liquides présentent le grand avantage de prévenir la dessiccation et de faciliter l'extraction de l'ADN ou de l'ARN [82]. Cependant, échantillonner dans un liquide dilue beaucoup notre échantillon. Ces types d'échantillonneurs sont ceux qui permettent d'obtenir les meilleurs pourcentages de d'infectivité, malgré le fait qu'ils puissent perdre jusqu'à 48% de l'échantillon [83]. Comme mentionné plus haut, on ne peut échantillonner longtemps avec des impacteurs liquide en raison de l'évaporation. Dans la famille des AGI, on retrouve maintenant le Biosampler® qui est encore moins destructif et plus efficace pour récolter les aérosols que l'AGI-30 [83].

1.3 Les bactériophages comme modèles viraux

1.3.1 Généralités

Les phages ont été codécouverts par Twort (1915) et d'Hérelle (1917) [22]. Il est assez surprenant que leur découverte soit arrivée aussi tardivement, soit 40 ans après le début des recherches d'envergure en bactériologie, mais sans microscope électronique, la preuve de leur existence était plus ardue. On note cependant des textes de 1896 qui mentionnent l'effet antiseptique de l'eau du Gange, qui se perd en filtrant ou chauffant l'eau [22]. Les gens de l'époque n'ont pas poussé l'étude, se disant qu'il s'agissait de composés chimiques volatils. D'Hérelle, quelles années plus tard, s'est aussi retrouvé face à un composé qui lysait des bactéries, mais a poussé beaucoup plus loin son questionnement. Il a permis de grandes avancées médicales en soignant des gens avec des phages, avant l'ère des antibiotiques [22]. Les phages ont été utilisés dans plusieurs domaines, mais leur potentiel reste peu exploité en aérovirologie. Pourtant, ils sont une avenue très intéressante en tant que modèle viraux.

Ce sont des virus qui n'infectent que les organismes procaryotes. Ils ont beaucoup de points en commun avec les virus eucaryotes : ils peuvent être enveloppés ou non, à ARN ou ADN, double ou simple brin, segmentés ou linéaires ou circulaires, d'une multitude de formes, caudés ou non, etc. [9]. Leur manipulation est très sécuritaire (niveau de biosécurité 1) et relativement facile, on peut aisément en obtenir de fortes concentrations, ils ont une grande diversité (environ 10 familles) et sont peu dispendieux à produire. De plus, la Food and Drug Administration (FDA) a déjà reconnu et accepté les phages comme standard de référence dans l'industrie pharmaceutique. Il est particulièrement important de mentionner que 96% des phages sont caudés [84] alors qu'aucun virus eucaryote ne possède cette caractéristique. Dans le présent projet, quatre phages non caudés ont été choisis. Ils sont tous différents au niveau génétique et l'un d'eux est aussi enveloppé. Il était important de sélectionner des phages très différents pour pouvoir les associés au plus grand nombre de virus eucaryotes possible. Étant

donné que la structure et le génome des virus peuvent fortement influencer leur persistance dans l'environnement, n'utiliser qu'un seul type de virus comme modèle viral serait bien loin de représenter la réalité.

1.3.2 Leur utilisation en tant que modèles

Les phages sont déjà utilisés comme modèles dans plusieurs domaines. Dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire, la *Food and Drug Administration* (FDA) recommande leur utilisation utilise pour tester l'efficacité de capture des filtres. Ils sont aussi utilisés comme modèles de virus entériques pour le traitement des eaux usées [85]. On les étudie aussi pour mieux comprendre comment fonctionnent les virus eucaryotes. Par exemple, l'ARN polymérase ARN dépendante de phi 6 est particulièrement étudiée pour mieux comprendre les Réovirus [86]. Leur potentiel en aérovirologie reste peu exploité et beaucoup d'études ont utilisé des phages caudés [87]. Les prochaines sections ainsi que le tableau 1 présentent les quatre phages qui ont été choisis en tant que modèles pour notre étude du comportement des virus dans l'air.

1.3.3 PR772

PR772 est un phage à ADN double brin linéaire d'environ 14 500 paires de base, de la famille des *Tectiviridae*. Il est de forme icosaèdre avec un diamètre de 53 nm. Il est composé d'une épaisse membrane interne et ne possède pas de queue. PR772 a pour hôte *Escherichia coli*, mais peut aussi se développer *sur Salmonella typhimurium* et *Proteus morganii* [88]. PR772 a été utilisé comme modèle pour l'évaluation de l'efficacité de filtres [89] [90] [91].

1.3.4 Phi6

Phi6 est un phage à ARN double brin, linéaire et segmenté d'environ 13 400 paires de base, de la famille des *Cystoviridae*. Il s'agit d'un phage enveloppé d'une couche lipidique, laquelle est probablement essentielle pour infecter son hôte, et ne possède pas de queue. Il est de forme icosaèdre et possède un diamètre de 60 nm excluant la couche lipidique [92]. Phi6 a pour hôte *Pseudomonas syringae*. Phi 6 a déjà été utilisé comme modèle, entre autres pour évaluer l'efficacité de capture d'échantillonneurs comme le Biosampler® [93] ou des filtres [94], comme analogue du virus de l'encéphalite équine [95], pour étudier l'inactivation des aérosols viraux par les UV [96] ou par l'ozone [97].

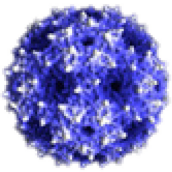
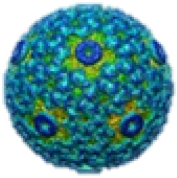
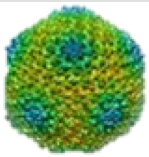
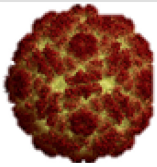
1.3.5 PhiX174

Phi X174 est un phage à ADN simple brin circulaire d'environ 5400 nucléotides, de la famille de *Microviridae*. Il est de forme icosaèdre, non caudé et d'un diamètre d'environ 25 nm. Il a pour souche hôte *E. coli*. Étant un coliphage, Phi X174 peut être utilisé comme indicateur de contaminations fécales [98]. Il a été utilisé comme modèle viral pour l'étude de l'effet de l'ozone [97] et des UV [96].

1.3.6 MS2

MS2 est un phage à ARN simple brin linéaire d'environ 3600 nucléotides, de la famille *Leviviridae* [99]. Il est aussi de forme icosaèdre, non caudé et d'environ 27 nm [100]. Il a pour souche hôte *E. coli*. Le phage MS2 a largement été utilisé comme modèle dans l'étude des aérosols. On l'a utilisé pour étudier la stabilité des aérosols [20], pour tester l'efficacité de capture de filtres pour les aérosols viraux [80], pour voir l'effet de facteurs tels l'ozone [97], le milieu de suspension ou l'humidité relative [101] sur leur infectivité, les performances de purificateur d'air [102] ou pour étudier la production d'aérosol par les toilettes [103].

Tableau 1: Ensemble des caractéristiques des quatre phages modèles choisis.

Phages	MS2	Phi6	PR772	PhiX174
Famille de phage	*Leviviridae*	*Cystoviridae*	*Tectiviradae*	*Microviridae*
Capside	-Une protéine structurale -Icosaèdre -27 nm	-Icosaèdre -86 nm	-Double capside -Icosaèdre - 53 nm	- Icosaèdre -25 nm
Enveloppe	non	oui	non	non
Génome	-Simple brin -ARN -Linéaire -Non segmenté -3569 nt	-Double brin -ARN -Linéaire -3 segments -13 385 pb	-Double brin -ADN -Linéaire -Non segmenté -14 492 pb	-Simple brin -ADN -circulaire -Non segmenté -5386 nt
Souche hôte	*E. coli*	*Pseudomonas syringae*	*E.coli*	*E.coli*
Température d'incubation	37°C	25°C	37°C	37°C
Virus eucaryotes avec similitudes	*Picornaviridae* *Caliciviridae*	*Reoviridae* *Orthomyxoviridae* *Paramyxoviridae* *Retroviridae*	*Adenoviridae*	*Circoviridae*
Images				

1.4 Virus eucaryote à l'étude : l'*Influenza*

Le virus de l'*Influenza* est un virus pouvant infecter les mammifères et les oiseaux. Son génome est composé d'ARN simple brin segmenté et il est enveloppé d'une couche lipidique. Il est de la famille des *Orthomyxoviridae* et comprend trois types : A, B et C. Le type A est celui qui cause la plupart des épidémies et pandémies, le type B peut aussi se propager chez l'humain et le type C a beaucoup moins d'intérêt en pathologie humaine. À la surface des virus de type A et B il y a deux protéines, soit l'hémagglutinine et la neuraminidase, qui permettent de diviser les virus en sérotype [104]. En raison de la nature de son génome, ARN simple brin et segmenté, et de la faible fidélité des protéines de réplication, le virus mute et réarrange ses segments rapidement. Il est donc en constant changement, au niveau génétique et phénotypique, lors de sa circulation au sein d'une population [105]. L'*Influenza* est très étudiée en raison des dommages qu'il peut causer dans une population et les répercussions économiques qu'il engendre, soit les soins de santé et l'absentéisme au travail.

Les modes de transmission de l'*Influenza* ne sont pas encore clairement établis et de vifs débats sur la question ont lieu [106]. Il est accepté que le contact direct et l'exposition aux gouttelettes soient responsables de nombreux cas de transmission, mais la voie des bioaérosols est fortement controversée. On n'en connait peu sur la quantité de virus émise par les patients et le diamètre des aérosols produits, contribuant ainsi au questionnement sur le mode de transmission [107]. Une excellente revue de littérature résume les évidences épidémiologiques et expérimentales sur le rôle des aérosols [108]. On mentionne, entre autres, une étude où l'on a exposé des humains à des aérosols d'*Influenza* et remarqué que la dose infectieuse est beaucoup plus faible que par inoculation intranasale [109]. Une autre étude faite avec deux groupes de patients tuberculeux, où l'un des groupes était dans une chambre avec des lampes à UV, démontre clairement que les UV diminuaient la transmission de l'*Influenza* [110]. Une autre revue de littérature sur l'*Influenza* conclut que ce virus peut rester

infectieux des heures sous forme d'aérosols contrairement à quelques minutes sur les mains [111].

Quelques études décrivent l'effet de différents facteurs environnementaux sur l'infectivité du virus de l'*Influenza*. Il semblerait que le virus de la grippe soit négativement affecté par de hautes humidités relatives [112] [113] [56] [114]. On a d'ailleurs observé dans les régions tempérées que lorsque l'humidité absolue diminue, environ 4 semaines plus tard, on observe une recrudescence d'*Influenza* au sein de la population [115]. La concentration de *l'Influenza* A est 2,4 fois plus importante à 10% d'humidité qu'à 90% d'humidité. Pour consulter les caractéristiques du virus de *l'Influenza*, voir le tableau 2. Une image représentant le virus de l'Influenza est présentée à la figure 11.

Tableau 2 : Caractéristiques du virus de l'*Influenza*.

Nom virus	Famille	Capside	Enveloppe	Génome
Influenza	Orthomixoviridae	80-120 nm	oui	ARN sb Segmenté (8 segments)

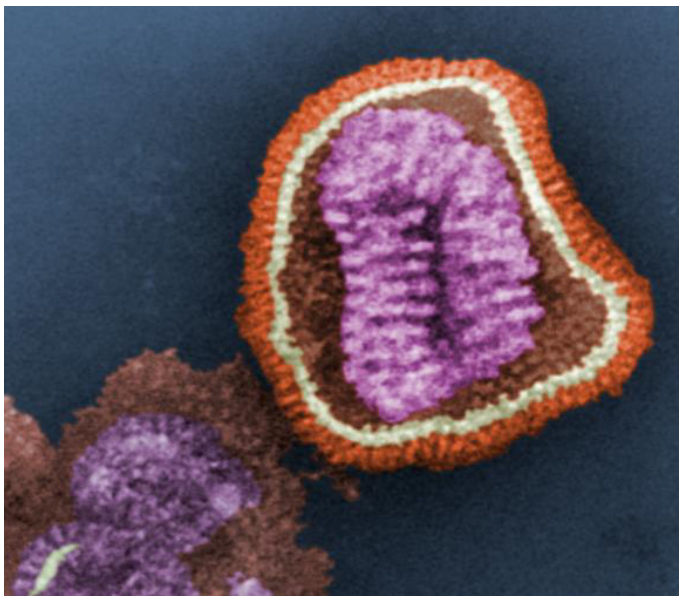


Figure 11: Virus de l'Influenza. Photo prise en microscopie électronique à transmission. Source: CDC.

1.5 Objectif des travaux de recherche

Tel que mentionné plus haut, l'étude des aérosols viraux est complexe. La faible concentration de virus, les dommages causés par les techniques d'échantillonnage ainsi que l'absence de techniques standardisées en aérovirologie font en sorte que la transmission par les aérosols est difficilement démontrable. Pourtant, plusieurs études épidémiologiques ou de mécanique des fluides, ainsi que des travaux en laboratoire abondent en ce sens.

C'est devant cette problématique que le présent projet a été mis sur pied. Il vise le développement de modèles standardisés, sécuritaires et efficaces pour l'étude du comportement des virus dans l'air. Cela permettra de mieux comprendre la survie des virus dans l'air sur de courtes et longues distances (mimé par un court et un long temps de suspension), leur résistance à différents stress environnementaux et leur niveau d'infectivité afin de mieux prédire les risques associés à leur inhalation. En utilisant des modèles sécuritaires, non pathogènes pour les mammifères, on diminue fortement la complexité des expérimentations. Cela permet de tester plus de conditions en moins de temps et même d'étudier la propagation des virus à l'extérieur du laboratoire, tels qu'en chambre d'hôpital, salle de classe, établissement d'élevage, etc.

1.5.1 Objectifs spécifiques

Une chambre environnementale rotative a été utilisée pour caractériser le comportement des phages dans différentes conditions. Cet appareil a été construit par Daniel Verreault et l'équipe technique de génie mécanique de l'Université de Tulane en Louisiane, sous la supervision des Drs Chad Roy et Caroline Duchaine. Cette chambre est un prototype unique, car les extrémités du cylindre la composant sont indépendantes de celui-ci. Cela offre l'avantage de nébuliser, d'échantillonner et d'exposer aux UV sans devoir arrêter la rotation.

La combinaison de techniques de culture traditionnelle et de biologie moléculaire a été utilisée pour les différents aspects de notre étude. Suite à l'exposition des phages aux conditions environnementales, des essais sur plaque étaient faits pour déterminer la quantité de phages infectieux dans l'échantillon. Ensuite, par technique de qPCR, le nombre total de génomes de phages présents (phages infectieux et non-infectieux) était déterminé afin d'établir des ratios (infectieux/nombre total).

Les objectifs spécifiques de recherche consistaient donc :

1. Mise en route de la chambre environnementale rotative (montage, performance et écriture d'un manuel d'instructions) :

2. Évaluer la résistance de quatre phages à l'humidité relative (20, 50 et 80%) à basse température (18°C) :

3. Évaluer la résistance de quatre phages deux températures (18 et 30°C) à haute humidité relative (80%) :

4. Évaluer l'effet des UV sur les phages (18C°, 20%) :

5. Valider nos modèles avec un virus eucaryote (*Influenza*).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 Bactériophages

Quatre bactériophages ont été utilisés dans ce projet (voir tableau 1). Les phages phi 6 (HER 102), phi X174 (HER 36), PR772 (HER 221) et leur souche hôte respective, *Pseudomonas syringae* (HER 1102), *Escherichia coli* (HER 1036) et *Escherichia coli* (HER 1221), ont été fournis par le centre de référence des virus bactériens, Félix d'Hérelle (www.phage.ulaval.ca). Le phage MS2 (ATCC 15597-B1) et son hôte, *Escherichia coli* (ATCC 15597) a été obtenu de *l'American Type Culture Collection* (ATCC).

Pour la culture des phages MS2, PR772 et phi X174, 3 ml d'une culture de la bactérie hôte, incubée toute la nuit (ON), ont été ajoutés à 30 ml de milieu *Tryptic Soy Broth* (TSB) jusqu'à l'obtention d'une densité optique (600nm) de 0,1. Ensuite, 300 µl de lysat de phages sont ajoutés à la culture bactérienne correspondante et mis sous agitation à 37°C. Les cultures sont surveillées jusqu'à la lyse complète ou partiellement complète des bactéries. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 3500 rotations par minute (rpm) pendant 10 minutes et filtration sur 0,45 µm du lysat. La solution de phages finale est entreposée à 4°C jusqu'à utilisation.

Pour le phage phi6, 100 µl de plusieurs dilutions du phage sont mélangés à 100 µl de culture ON de *Pseudomonas syringae* dans 3 ml de TSB 0,75% agar. Le tout est coulé sur boîtes de Pétri de TSB 1,5% agar et incubé à 25°C pour la nuit. Le lendemain, la couche d'agar du dessus, contenant les phages, est raclée et mise dans un tube avec 5 ml de tampon de phage (Tris-HCL 10 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, $MgSO_4$ 10 mM). Le tout est mis à agitation lente pour 6 heures et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et filtration. Le titre des phages a été déterminé par culture de dilutions sériées et compte de plages de lyse [116].

2.2 Nébulisat

Avant chaque nébulisation, un mélange des quatre bactériophages était ajouté à du tampon de phage pour un volume final d'environ 50 ml. La concentration des phages dans le nébulisat variait de 10^8 à 10^9 pfu/ml. Des essais ont été faits afin de vérifier si différentes concentrations de chaque phage pouvaient influencer les résultats. De l'anti-mousse A de Sigma-Aldrich était ajouté au mélange pour éviter la formation de mousse dans le nébuliseur. L'anti-mousse n'avait aucun effet sur l'infectivité des bactériophages et sur la performance des réactions PCR (résultats non montrés).

2.3 Génération d'aérosols

Pour l'ensemble des expérimentations, les aérosols ont été générés avec un Collison 6 jets (BGI Inc., Walthman, Mass.) alimenté avec de l'air médical à une pression de 20 psi, ce qui équivaut à une vitesse de 12 L/minute. L'aérosolisation du mélange de phages durait 10 minutes dans le but de générer assez d'aérosols pour remplir la chambre environnementale rotative (CER).

2.4 Contrôle de l'humidité et de la température

À la sortie du Collison, l'aérosol passe au travers d'une série de tubes de desséchants sous forme de billes, afin d'atteindre une humidité relative donnée, soit 20, 50 ou 80%. À chaque changement de condition, différents montages étaient testés afin d'obtenir la bonne humidité relative. La stabilité des conditions, jusqu'à une durée de 14 heures, était aussi testée avant d'entamer les expérimentations. Pour la condition environnementale de 30°C et 80% d'humidité relative, un humidificateur était connecté à la CER en même temps que le Collison pour atteindre l'humidité voulue.

Deux fours Pelletier ont été utilisés pour augmenter ou diminuer la température de la CER à 18 et 30 °C. L'évolution de l'humidité et la température étaient suivies à l'aide d'une sonde Omega directement insérée dans un port de la CER, et avec son logiciel, *TRH Central*.

2.5 Exposition aux stress environnementaux

Après les dix minutes de nébulisation, la CER était scellée et les aérosols produits étaient maintenus en suspension pour 0, 6 ou 14 heures. Un échantillon du contenu de la chambre était pris au début et à la fin de la période d'exposition avec un *Aerodynamic Particles Sizer* (APS; model 3321, TSI Inc.). Cette mesure permettait de vérifier si le nombre et la taille des aérosols étaient semblables d'une expérience à l'autre. L'APS fonctionnait à une vitesse de 5 litres/min pendant 20 secondes.

2.6 Échantillonnage des particules virales

Un SKC Biosampler®, contenant 20 ml de tampon de phage, a été utilisé pour l'échantillonnage des particules virales. La vitesse d'aspiration était de 12,5 L/min. Cet appareil a été choisi car c'est celui qui endommage le moins les virus, selon les résultats des expérimentations de Nathalie Turgeon (non publiés). Le projet consistant à vérifier l'effet des conditions environnementales sur la persistance des virus, nous devions ajouter le moins de stress possible par les techniques d'échantillonnage pour démontrer les risques potentiels du transport des aérosols. L'échantillonneur était connecté à une pompe GILAIR-5 (Sensidyne Inc. Clearwater, FL), calibrée avec un Dry cal DC-1 (Bios International Corporation, Butler, NJ). L'échantillonnage durait 20 minutes pour collecter environ 98% du contenu de la chambre (voir figure 12). Le liquide de collection était gardé à 4°C jusqu'aux tests d'infectivité par compte de plages de lyse. Les tests étaient faits dans les 3 heures suivant l'échantillonnage.

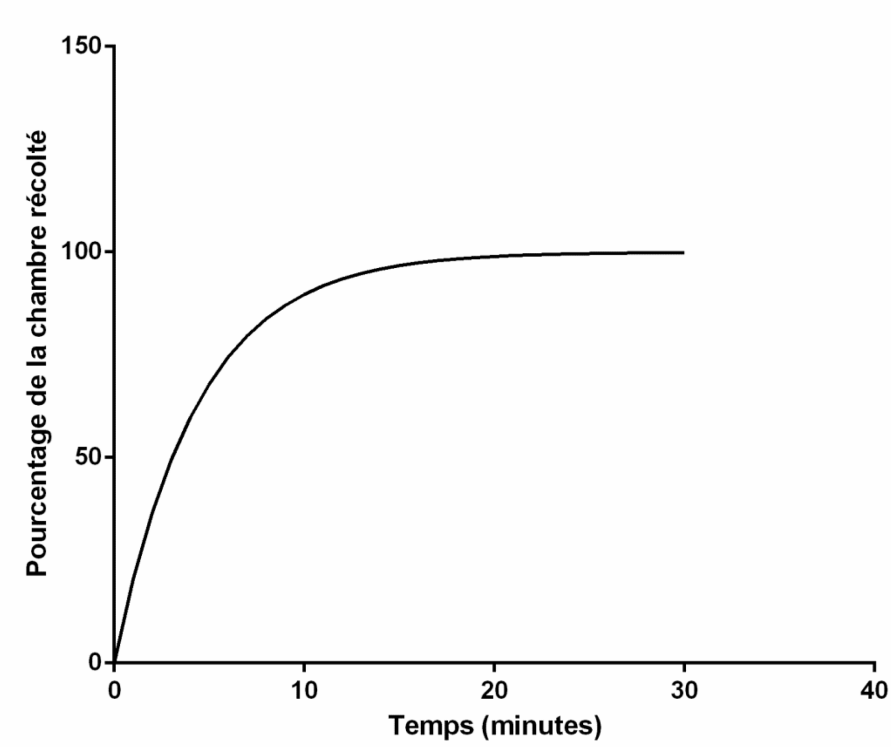


Figure 12: Graphique du pourcentage du contenu de la chambre récolté par le SKC Biosampler®, selon le temps d'échantillonnage.

2.7 Essais de plaques

Pour calculer la proportion de phages toujours infectieux après exposition aux stress, 100 µl du liquide de collection du Biosampler étaient mélangés à 100 µl de culture ON de la souche hôte, dans 3 ml de TSB 0,75% agar. Le tout est coulé sur boîte de Pétri de TSB additionné de 1,5% agar et incubé à 37°C ou 25°C, selon la souche, pour la nuit. La manipulation était refaite avec plusieurs dilutions du liquide de collection et chacune des souches bactériennes.

2.8 Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN pour les phages MS2 et phi 6 a été faite à l'aide de la trousse Quiagen's QIAamp® Viral RNA. La manipulation a été faite suivant les

directives du manufacturier, excepté pour l'ajout RNA carrier au tampon AVL, qui diminuait l'efficacité d'extraction [89].

2.9 Synthèse de l'ADN complémentaire

Avant la synthèse d'ADN complémentaire, les échantillons étaient soumis à un traitement-choc à la chaleur, soit 5 minutes à 110°C suivi 5 minutes sur la glace. La synthèse d'ADNc a été faite avec la trousse iScript cDNA Synthesis® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Le mélange réactionnel final était comme suit : 5 µl d'échantillon, 4 µl de mix de réaction iScript 5X, 1 µl de transcriptase inverse iScript et 10 µl d'eau sans nucléase. La réaction PCR était faite selon les recommandations du manufacturier.

2.10 Amorces et sondes

Les amorces et les sondes utilisées sont décrites dans les tableaux 3 et 4. Pour MS2 et phi6 elles sont tirées de Gendron *et al.* 2010 [94], pour phiX174 de Verreault *et al.* 2010 [117] et pour PR772 de Turgeon *et al. 2013 (en préparation).*

2.11 Réaction en chaîne de polymérisation quantitative (qPCR)

Toutes les qPCR ont été faits avec le DNA Engine Opticon 2 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). Les échantillons ont été analysés avec l'Opticon Monitor Software version 2.02.24. Les mélanges de réaction PCR avaient une concentration finale de 1X de iQ Supermix (Bio-Rad Laboratories). Les concentrations des sondes et d'amorces pour les réactions des quatre phages, ainsi que le volume d'échantillon ajouté au mélange, sont décrits dans le tableau 3. Le volume final de chaque réaction était de 25 µl. Une courbe standard était faite à chaque qPCR en utilisant des dilutions de 10^0 à 10^7 copies de plasmides contenant un gène de référence de chaque phage. Les protocoles qPCR étaient tel

que suit : 94°C pour 3 min (hot start) suivie de 40 cycles de 95°C pour 15 sec et 60°C pour 60 sec (phiX174, PR772 et MS2). Pour phi6, la dénaturation dure 20 secondes. Les essais qPCR ont été faits en duplicata.

Tableau 3 : Les concentrations des sondes et amorces pour les réactions des quatre phages et volumes d'échantillon ajoutés au mélange réactionnel.

Phages	[Sonde]	[Amorces F+R]	Échantillon (µl)
Phi6	300150 nm	1 µM	2
MS2	150300 nm	1 µM	2
PhiX174	200 µM	1 µM	5
PR772	200 µM	1 µM	5

Tableau 4 : Amorces et sondes utilisées pour les réactions PCR.

Phage	Nom de l'amorce	Séquences	Position sur le génom	Références
phi6	phi6T For	For : 5'-TGGCGGCGGTCAAGAGC-3'	430-446	[94]
	phi6T Rev	Rev: 5'-GGATGATTCTCCAGAAGCTGCTG-3'	530-506	[94]
		Probe: 5'-/HEX/CGGTCGTCGCAGGTCTGACACTCGC/3BH-3'	450-475	[94]
MS2	MS2 1 For	For: 5'-GTCCATACCTTAGATGCGTTAGC-3'	1261-1284	[94]
	MS2 1 Rev	Rev: 5'-CCGTTAGCGAAGTTGCTT GG-3'	1420-1401	[94]
		Probe: 5'-/FAM/ACGTCGCCAGTTCCGCCATTGTCG/3BHQ_1-3'	1391-1367	[94]
phiX174	Prim phiX174 For	For: 5'-ACAAAGTTTGGATTGCTACTGACC-3'	508-531	[117]
	Prim phiX174 Rev	Rev: 5'-CGGCAGCAATAAACTCAACAGG-3'	630-609	[117]
		Probe: 5'-/56-FAM/CTCTCGTGCTCGTCGCTGCGTTGA/3BHQ_1-3'	533-556	[117]
PR772	PR772 For	For: 5'- CCTGAATCCGCCTATTATGTTGC-3'	4538-4560	Non publié
	PR772 Rev	Rev: 5'- TTTTAACGCATCGCCAATTTCAC-3'	4663-4641	Non publié
		Probe: 5'-/FAM/CGCATACCAGCCAGCACCATTACGCA/3IABlk_FQ-3'	4639-4614	Non publié

2.12 Analyse des résultats

À la suite de l'échantillonnage, la proportion de phages infectieux était déterminée par compte de plages de lyse sur tapis bactérien. Le reste de l'échantillon était gardé à 4°C jusqu'au lendemain, puis mis à -20°C jusqu'au analyses subséquentes (extraction d'ARN, RT, cDNA, qPCR). Une fois la qPCR faite, pour obtenir la quantité totale de phages (infectieux et non-infectieux), le pourcentage d'infectivité était calculé comme suit:

$$\frac{UFP/ml}{molécules\ d'ADN ou\ ARN/ml} \times 100 = pourcentage\ d'infectivité$$

2.13 Évaluation des performances de la CER

Un des objectifs du projet étant la mise en route de la chambre rotative, voir figure 13 et 14, plusieurs modifications ont dû être apportées, entre autres pour répondre aux normes CSA (Canadian Standards Association) ou pour améliorer la mécanique. L'élaboration de montages expérimentaux a ensuite été entreprise: tubes de desséchants tubes de cuivre reliant les desséchants, tubulure pour relier desséchants à la CER, tubulures pour Collison, tubulures pour SKC Biosampler®, filtre HEPA, sondes d'humidité, de température et d'ultraviolets, ainsi que leur logiciel. La description de l'ensemble des montages est disponible dans le manuel d'instruction, rédigé par moi-même, annexé à ce mémoire.

Par la suite, il a été vérifié que le prototype de chambre répondait bien aux attentes : maintien de la température et de l'humidité relative sur de longues périodes, capacité de maintenir la rotation sur de longues périodes, maintien de la température et de l'humidité relative en présence d'ultraviolets. L'étanchéité de l'ensemble du dispositif a aussi été vérifiée.

Finalement, le comportement des particules a été étudié. Il a d'abord été vérifié que la rotation de la chambre environnementale avait réellement un impact sur le maintien en suspension des particules. Trois vitesses de rotation ont été testées, soit 1 rpm, 0,47 rpm et aucune rotation. Du tampon de phage 1X a été nébulisé avec le Collison 6 jets. L'humidité relative de l'aérosol était de 30% suite à un passage dans les tubes de desséchants. À intervalles réguliers de 30 minutes, pour une période de 5 heures, un échantillon d'air de 20 secondes de la chambre environnementale rotative était pris avec un APS. Le facteur de dilution des échantillons pris avec l'APS tout au long de l'expérimentation a été pris en considération. Avec les résultats de l'APS, la quantité et la grosseur des particules dans le temps ont été évaluées.

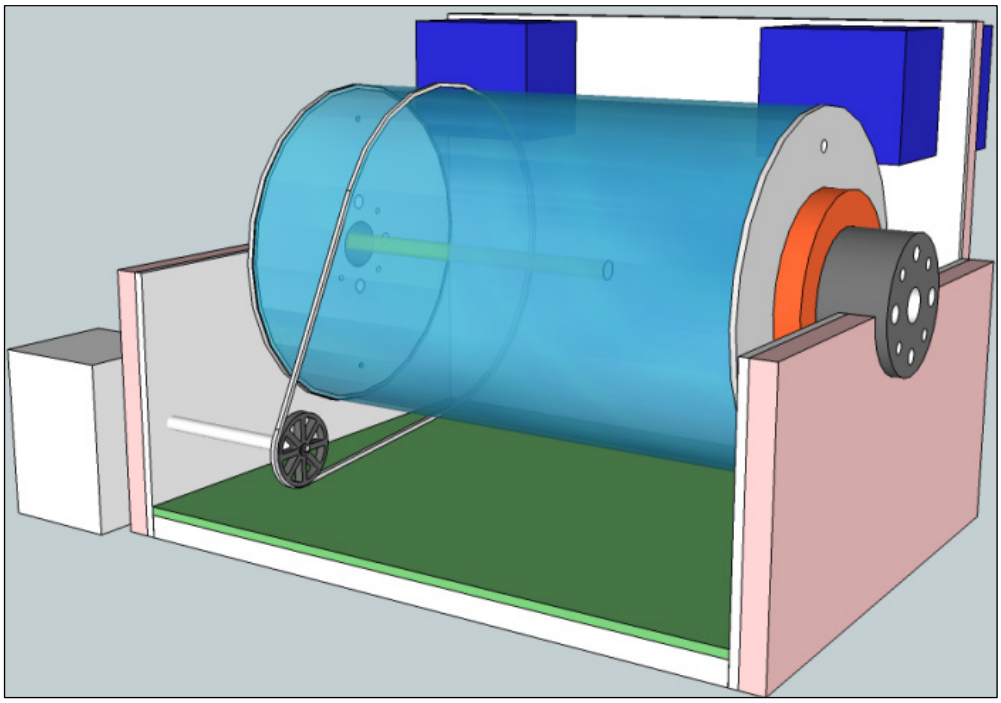


Figure 13: Chambre environnementale rotative. Visualisation 3D des composantes. Le système de rotation n'est pas identique au produit final. On peut voir la lampe UV à l'intérieur ainsi que les ports aux extrémités. Les cubes bleu royal représentent les fours pelletier, servant à chauffer ou climatiser l'air de la boîte entourant la chambre. Une partie du boîtier est non illustrée.

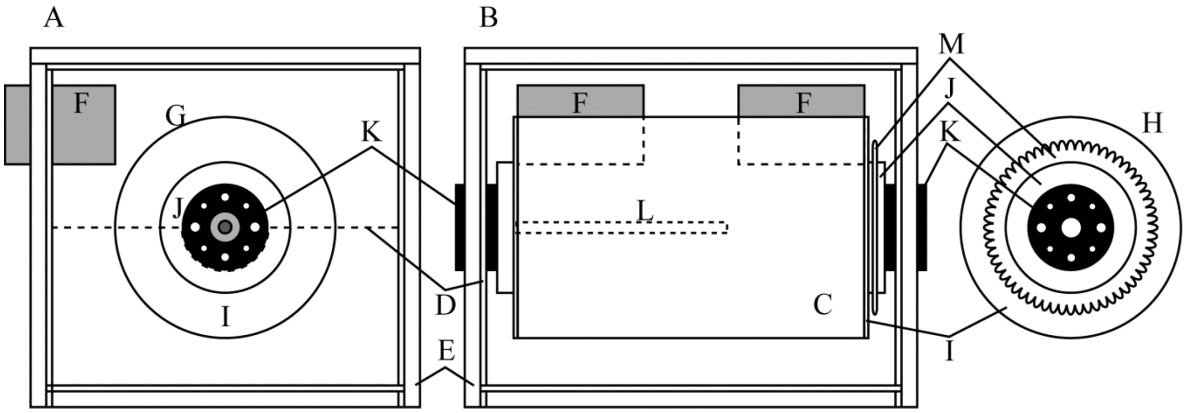


Figure 14: Chambre environnementale rotative. (A) vue de la largeur, (B) vue de la longueur, Un cylindre d'aluminium de 55L (C) est placé à l'intérieur d'une boite de polycarbonate (D) dont la température est contrôlée par des appareils thermoélectriques (F). Les extrémités de la chambre (G et H) sont maintenues au cylindre par des loquets et gardent la chambre étanche. La lampe UV est située à l'intérieur de la chambre (L). La rotation est assurée par un moteur à vitesse contrôlé situé à l'extérieur de la boite de polycarbonate. Ce moteur est relié à la chambre par une chaine, qui elle est reliée à une roue dentelée (M). L'isolation est faite avec des feuilles de styromousse (E).

2.14 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes humidités relatives

Pour évaluer la résistance des quatre phages à différentes humidités relatives, ces derniers ont été nébulisés dans la CER à des humidités de 20, 50 ou 80%. Dans toutes les conditions, la température était maintenue à 18°C. Brièvement, le mélange de phages était nébulisé une première fois 10 minutes à 12 L/minute, correspondant à une pression de 20 psig. Ensuite, un échantillon des aérosols présents était pris avec l'APS afin de vérifier la concentration et le diamètre des particules présentes. Finalement, le SKC Biosampler® était activé pendant 20 minutes pour récolter le contenu de la chambre (environ 98% du contenu). L'ensemble de l'air de la chambre était récolté afin de s'assurer de détecter les phages par culture. Cette manipulation consistait en notre temps 0 heure. La chambre était ensuite purgée pendant environ 30 minutes avec de l'air médical.

La même manipulation était refaite une deuxième fois, mais avec 6 heures d'attente entre la fin de la nébulisation et l'échantillonnage avec le SKC

Biosampler®. Finalement, on répéta une troisième fois, mais avec un temps de suspension de 14 heures. Chaque condition (20, 50 et 80 % HR à 18°C) a été faite en triplicata ou plus.

2.15 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes températures

Pour tester la résistance des quatre phages à différentes températures, ceux-ci ont été aérosolisés à 18°C et 30°C. Dans toutes les conditions, une humidité relative de 80% a été maintenue.

L'humidité relative de 80% a été choisie, car elle représentait la condition la moins stressant pour la majorité des phages étudiés. À chaque condition testée, la condition ne variant pas, ici l'humidité relative, était choisie de manière à ne pas faire subir trop de stress aux phages.

Les expérimentations se sont déroulées telles que décrites dans la section 2.13. Pour obtenir une humidité relative de 80% à 30°C, un humidificateur, contenant de l'eau autoclavée, a été utilisé en même temps que le Collison. Le Collison à lui seul ne permettait pas d'atteindre une aussi haute humidité. L'air permettant la nébulisation de l'eau passait à priori au travers d'un filtre HEPA. Toutes les conditions ont été faites en triplicata ou plus.

2.16 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles aux U.V.

Pour évaluer la résistance des quatre phages aux UV, ils ont été nébulisés dans la chambre à 20% d'humidité relative. La température était maintenue à 18°C (température la moins stressant pour les phages). Les phages ont été nébulisés pendant 10 minutes, laissés en suspension pendant 15 minutes pour stabiliser les aérosols et permettre une distribution uniforme de ceux-ci dans la chambre, puis exposés aux ultraviolets pour une période de 0, 3, 6 et 10 secondes. Finalement,

les aérosols étaient échantillonnés pendant 20 minutes avec le SKC Biosampler®. L'exposition aux UV était suivie grâce à une sonde UV installée à l'intérieur de la chambre. Les données étaient fournies en ampères par le logiciel d'analyse et devaient être converties en mW/cm^2. La formule suivante était utilisée :

$$\boldsymbol{y = 0,625x - 2,5}$$

Où *x* est exprimé en milliampères et *y* en mW/cm^2.

2.17 Étude pilote : validation des modèles avec virus eucaryote

Pour valider nos modèles de phages, ceux-ci ont été co-nébulisés en présence du virus de l'*Influenza* atténué, le *Flumist*. Le *Flumist* est un vaccin nasal qui permet l'immunisation contre l'Influenza des sous-types A et B contenus dans le vaccin, tout dépendant des souches prévalentes de l'année. La co-nébulisation permet d'exposer nos modèles et le virus eucaryotes exactement aux mêmes conditions. Autrement, une variation dans les conditions pourrait engendrer différentes réponses de nos virus, et amener à conclure, de façon erronée, qu'ils se comportent différemment.

La séquence de manipulations était la même que pour l'évaluation de la résistance à l'humidité et à la température. Le même mélange de phages était fait, mais 1 ml de *Flumist* était ajouté à celui-ci et le tout mis dans le nébuliseur. Une partie de l'échantillon récolté par le SKC Biosampler® était utilisée pour les tests d'infectivité des phages sur tapis bactérien, tandis que l'autre partie était filtrée sur 0,45 µm, pour s'assurer qu'il n'y avait pas de contamination bactérienne, et utilisée pour tester l'infectivité de l'*Influenza*.

Les tests d'infectivité de l'*Influenza* ont été faits sur œufs embryonnés de poule. Brièvement, les œufs sont reçus et incubés 10 jours précédant l'expérimentation à 37°C. Pendant ces 10 jours, les œufs sont régulièrement examinés pour déceler des défauts dans la coquille, vérifier la bonne croissance des embryons et repérer les *early death*. Pour ce faire, on dépose une lampe sur

les œufs qui nous permet de voir s'il y a du mouvement à l'intérieur (embryon vivant) et la grosseur de celui-ci (croissance normale). La journée de l'expérimentation, plusieurs dilutions de l'échantillon du Biosampler® sont faites et 5 œufs sont utilisés par dilution. Au moment de l'infection, un minuscule trou est fait dans la coquille, juste au-dessus de la poche d'air, et 200 µl de la bonne dilution sont injectés dans l'œuf à l'aide d'une seringue (Covidien monoject 1 mL insulin seringue 1188100777). Finalement, le trou est recouvert de colle et les œufs sont incubés à 33°C pour permettre la croissance de l'embryon, mais aussi celle du virus de l'*Influenza* modifié qui ne croît qu'à cette température. Les œufs sont incubés 2 jours en présence de virus et mis à 4°C pour la nuit. Le lendemain, le liquide allantoïque est récolté et gardé à 4°C.

Afin de vérifier la présence de virus dans le liquide allantoïque, un test d'hémagglutinine est fait (voir figure 15). Brièvement, plusieurs dilutions du liquide allantoïque de chaque œuf sont faites dans du tampon PBS (*phosphate buffer saline*), du sang de poule est ajouté et après 30 minutes d'attente on vérifie s'il y a hémagglutination des globules rouges. Le virus de l'*Influenza* a une protéine de son enveloppe appelée hémagglutinine, ou HA, qui se lie aux récepteurs de l'acide sialique sur les cellules. Le virus se lie aussi aux érythrocytes causant la formation d'un ‘’treillis’’ qui va tapisser le puits de la plaque (plaques transparentes, 96 puits, fond en U, non traitées et stériles, costar 2797). C'est ce qu'on appelle hémagglutination. Les globules rouges qui ne sont pas liés à l'*Influenza* vont former un point rouge dans le fond du puits (voir figure 16). Finalement, les échantillons sont aussi analysés en qPCR pour déterminer la quantité totale de virus *Influenza* ainsi que de chaque phage.

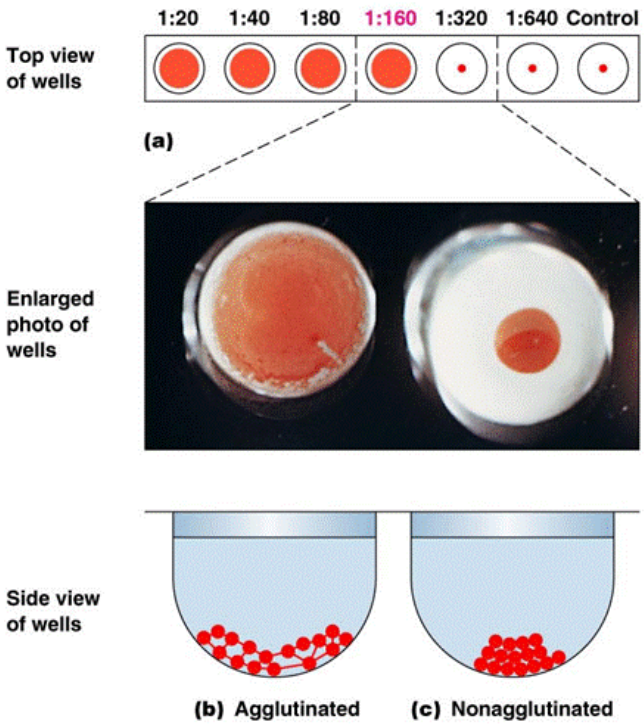


Figure 15: Schéma du test d'hémagglutination. Le puits contrôle est un contrôle négatif (copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings).

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Évaluation de la performance de la CER

La performance de la chambre a été évaluée en observant la stabilité de la température et de l'humidité relative, et en étudiant le comportement des particules dans le temps. Un Collison 6 jets a été utilisé pour nébuliser du tampon de phage à 12 L/min. Pour atteindre la bonne humidité, les aérosols traversaient une série de desséchants.

La température de la chambre était modulée par la boîte de polycarbonate l'entourant. Pour augmenter la température de 8°C à 45°C, cela prend environ 40 minutes de plus à la chambre pour atteindre la même température que la boîte de polycarbonate (figure 16). La température reste stable, dans une fourchette de ± 0,5°C de la valeur de base, pour une longue période de temps (le temps testé dans les expérimentations était de 48 heures). L'ouverture de la lampe UV pour une courte période de temps (5 minutes) n'a pas d'impact sur la température de la chambre.

Une fois l'humidité relative désirée est atteinte, la chambre était scellée et laissée en rotation pour une période de 14 heures, puis les humidités initiale et finale étaient comparées. À 18°C, avec une rotation de 1 rpm, l'humidité relative à diminuée de 2,2% ± 0,2, 3,6 ± 0,4% et 3,3 ± 0,6% en 14 heures pour des humidités initiales de 20, 50 et 80 % respectivement.

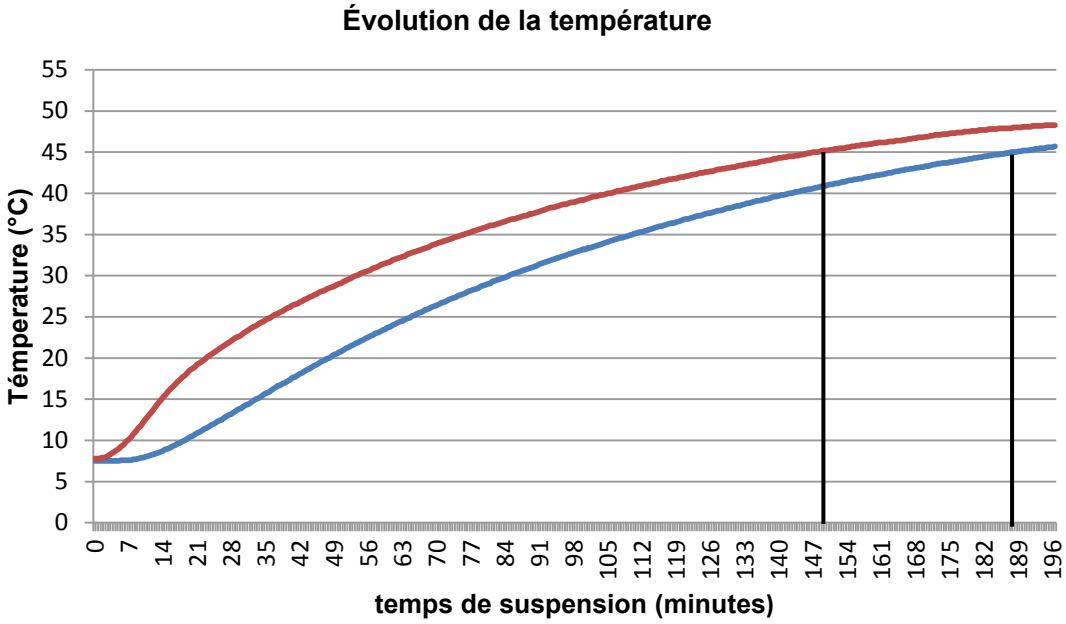


Figure 16: Modulation de la température dans la CER. Évolution de la température de la boîte de polycarbonate (courbe rouge) et de la chambre rotative (courbe bleue) dans le temps (minutes). Les lignes noires indiquent l'intervalle de temps nécessaire à la chambre pour atteindre la température de la boîte (45°C). Cet intervalle est d'environ 40 minutes.

Pour étudier le comportement des aérosols dans la chambre rotative, la concentration de particules et la variation du diamètre aérodynamique de la masse médiane (MMAD)[2] ont été enregistrées sur une période de 5 heures, à une rotation de 1 et 0 rpm. La température était de 21°C et l'humidité relative à 30% pour l'ensemble des expérimentations. En moyenne, le nombre initial de particules par litre d'air était de 2E+06 dans la chambre rotative. Le MMAD initial était de 1,36 ± 0,03 µm et 1,28 ± 0,02 µm pour des vitesses de rotation de 1 et 0 rpm respectivement. Le MMAD augmentait à 1,42 ± 0,05 µm après 5 heures de rotation à 1 rpm et diminuait à 0,96 ± 0,01 µm après 5 heures sans rotation (0 rpm), voir figure 17. La concentration des particules diminue de 31,96% ± 0,84% à 1 rpm et de 58,02% ± 2,98% à 0 rpm, voir figure 18.

[2] Le MMAD est le diamètre de particules qui divise la fréquence de distribution en deux; 50% de la masse des aérosols a un diamètre plus grand que le MMAD et le 50 % restant a un diamètre plus petit que le MMAD.

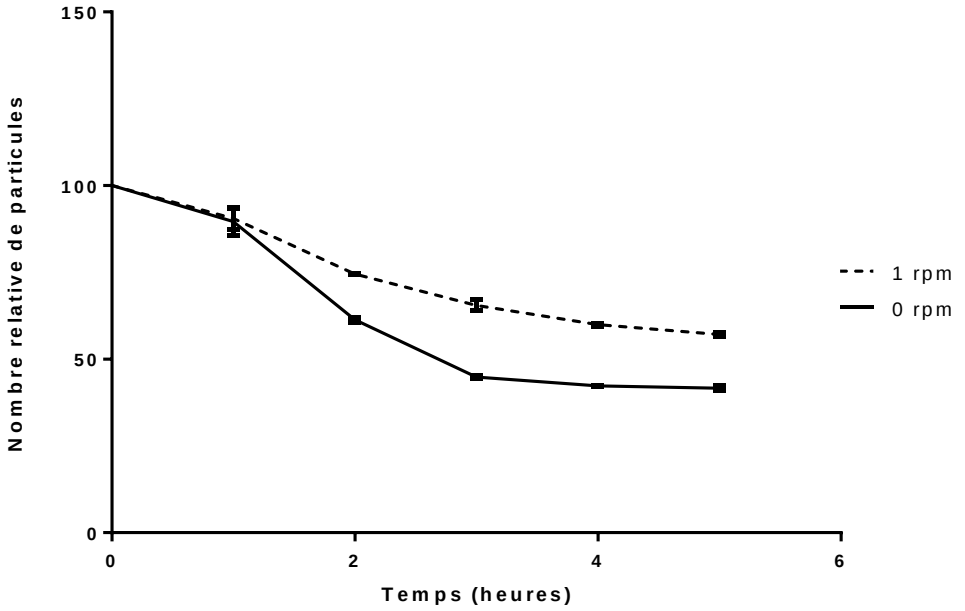


Figure 87 : Évolution du nombre de particules dans la CER. Évolution du nombre de particules, en pourcentage du nombre de départ, dans le temps (heures), en fonction de la vitesse de rotation (rpm) soit de 1 rpm (ligne hachurée) et 0 rpm (ligne pleine), à 21°C et 30% d'humidité relative.

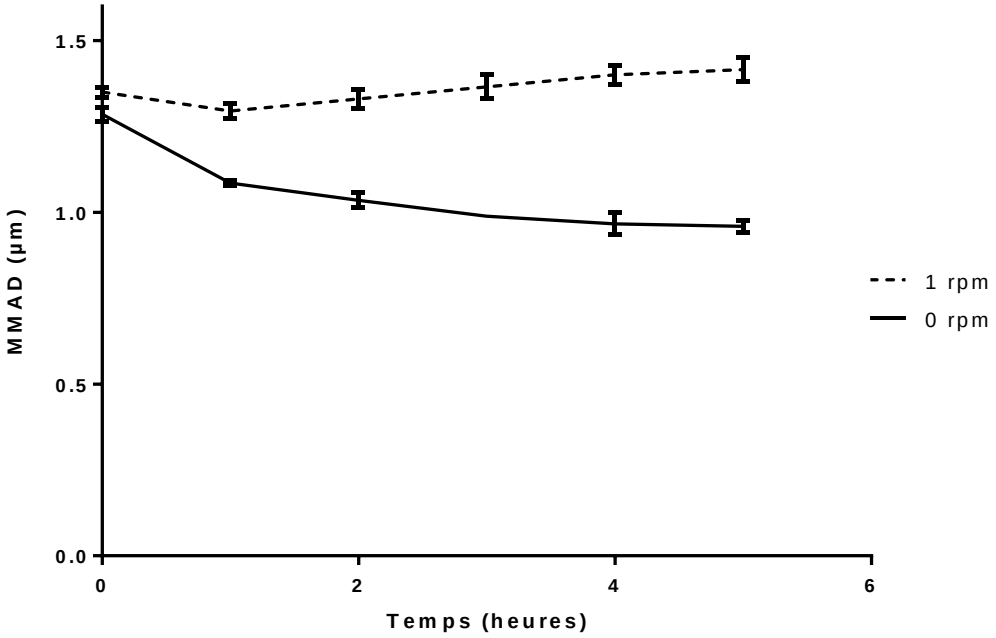


Figure 98: Évolution du MMAD dans la CER en fonction du temps. Évolution du MMAD dans le temps (heures) en fonction de la vitesse de rotation (rpm) soit de 1 rpm (ligne hachurée) et 0 rpm (ligne pleine), à 21°C et 30% d'humidité relative.

3.2 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes humidités relatives

L'effet de l'humidité sur la résistance des bactériophages a été évalué en exposant ceux-ci à 20, 50 et 80% d'humidité relative, à une température constante de 18°C. Les aérosols sont restés en suspension pour des périodes de 0 à 14 heures. Les résultats sont présentés à la figure 19. Des analyses statistiques ont été faites afin de vérifier si l'humidité et le temps avaient un effet significatif sur la persistance des phages. Les lettres au-dessus des colonnes permettent d'indiquer s'il y a une différence significative de la survie entre les humidités à l'intérieur d'un même temps. Par exemple, pour PR772, à 0 heure, il y a une différence entre 20% et les deux autres conditions d'humidités relatives, mais pas entre 50 et 80%. Les symboles, quant à eux, indiquent s'il y a un effet significatif du temps sur la persistance pour une même humidité. Par exemple, pour phiX174, il y a un effet du temps à 20 et 50%, mais aucun à 80% HR.

Le phage phiX174 préfère de manière significative ($p < 0,05$) des humidités relatives de 80% lorsque comparé à 20 et 50% d'humidité. Il n'y pas de différences significatives entre les deux plus basses valeurs d'humidité, mais une tendance est visible sur le graphique pour une augmentation de la résistance en fonction de l'humidité. Pour ce même phage, il y a un effet du temps sur la survie pour les humidités de 20 et 50%, mais aucun à 80%.

Le phage PR772 préfère aussi de manière significative ($p < 0,05$) des valeurs d'humidités relatives plus élevées. On remarque un effet plus marqué de l'effet de l'humidité par une augmentation plus abrupte de la persistance en fonction de l'humidité. PR772 est aussi affecté par de longs temps de suspension ($p < 0,001$) à tous les niveaux d'humidité.

MS2 est stable à tous les niveaux d'humidité relative, avec une légère préférence pour 50 et 80 % au temps 0. On observe aussi un léger effet du temps

après 14 heures de suspension, mais beaucoup moins notable que pour les deux phages précédents, avec une pente moins abrupte de l'augmentation de la survie en fonction de l'humidité.

Phi 6 réagit de manière tout à fait différente que les trois premiers phages, étant plus résistant à de faibles taux d'humidité. Cette préférence est significative pour le temps de suspension de 6 ($p < 0,001$) et 14 heures ($p < 0,01$). À 20 et 50% d'humidité, il n'y a aucun effet du temps, mais à 80% il y a un effet significatif.

3.3 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes températures

L'effet de la température sur la résistance des bactériophages a été évalué en exposant ceux-ci à 18°C et 30°C, à une humidité relative constante de 80%. Les aérosols sont restés en suspension pour des périodes de 0, 6 et 14 heures. Les résultats sont présentés à la figure 20. Les lettres et les symboles ont la même signification que sur la figure 19.

Il y a un effet significatif de la température sur la survie du phage phiX174, avec une meilleure résistance à basse température. Il n'y a aucun effet du temps à 30°C et 80% HR, tel qu'observé à 18°C et 80%. Il y a aussi un effet négatif lors d'une hausse de la température pour le phage MS2. On observe aussi le même effet du temps pour les deux températures à 80% HR. PR772 n'est pas affecté par des hausses de températures de 18 à 30°C. Finalement, pour le phage phi 6, aucun phage infectieux n'a été détecté à 30°C.

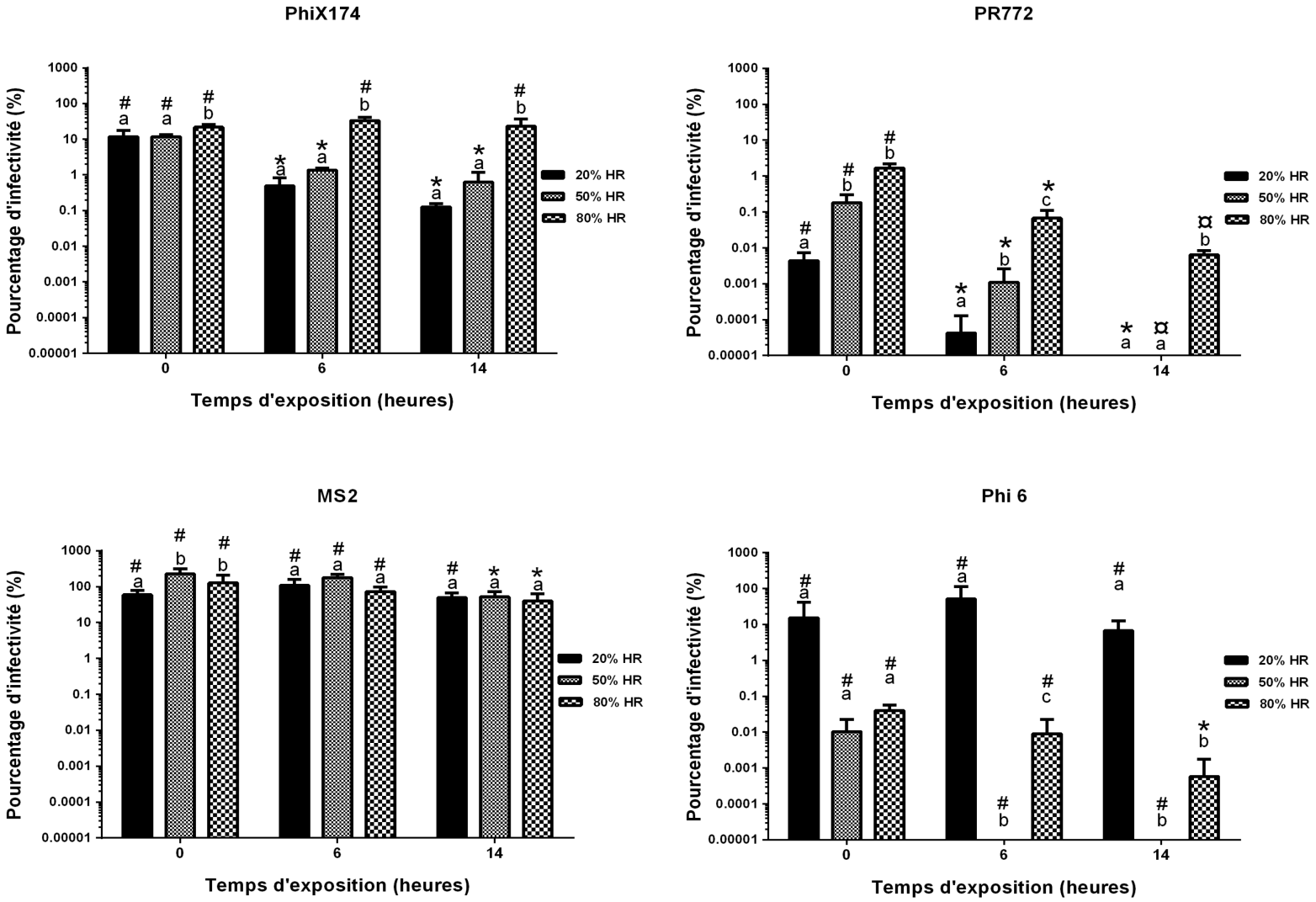


Figure 19: Effet de l'humidité sur l'infectivité des phages en fonction du temps de suspension à 18°C. Chaque motif de bande du graphique représente une humidité différente (20, 50 et 80%). Les lettres au-dessus des colonnes permettent d'indiquer s'il y a une différence significative de l'infectivité entre les humidités pour un même temps. Les symboles indiquent s'il y a un effet significatif du temps sur la l'infectivité pour une même humidité.

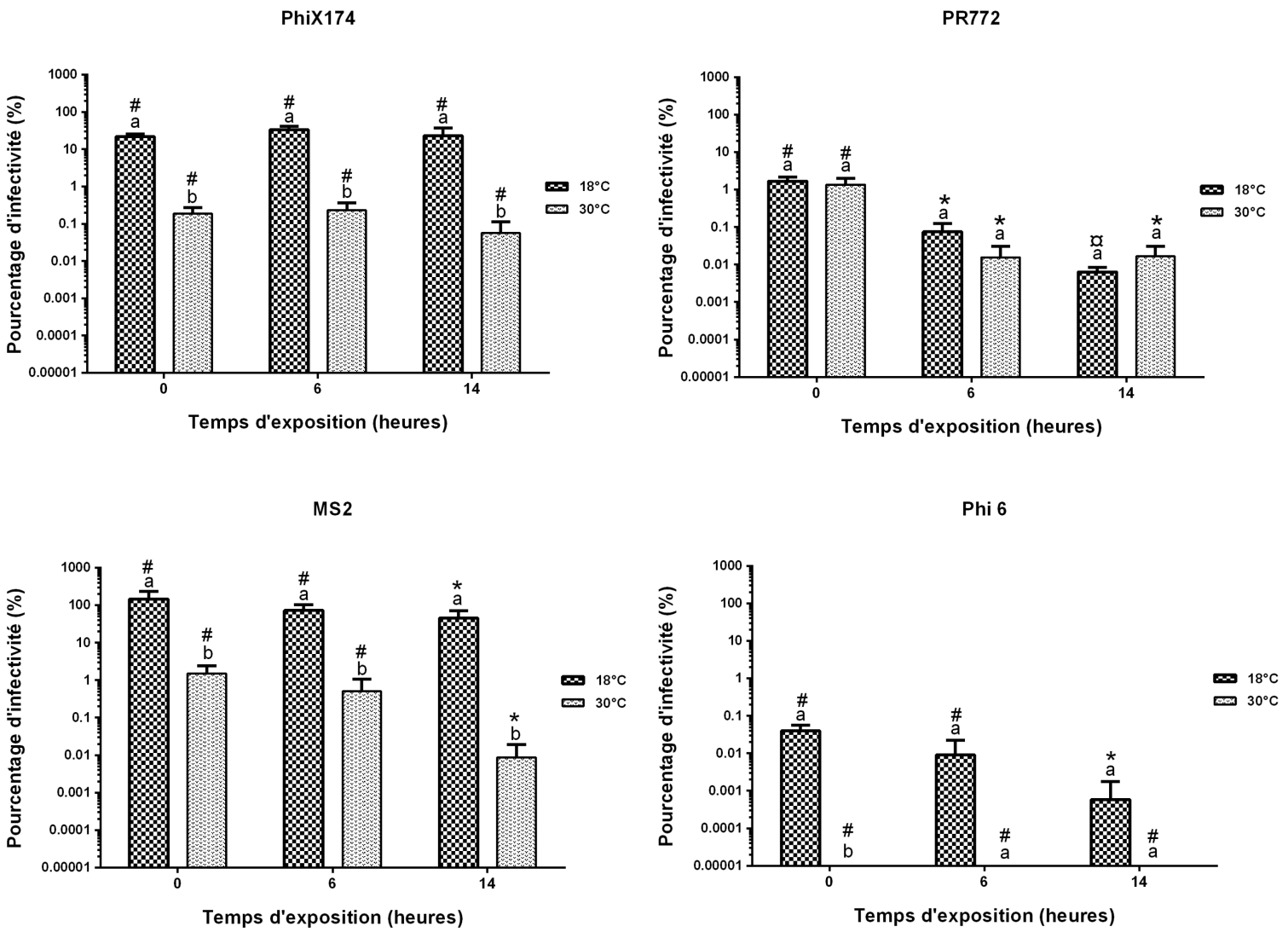


Figure 20: Effet de la température sur l'infectivité des phages en fonction du temps de suspension à 80% HR.
Chaque motif de bande du graphique représente une température différente (18°C et 30°C). Les lettres au-dessus des colonnes permettent d'indiquer s'il y a une différence significative de l'infectivité entre les températures à l'intérieur d'un même temps. Les symboles indiquent s'il y a un effet significatif du temps sur la l'infectivité pour une même température.

3.4 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles aux U.V.

La résistance des phages aux UV a été évaluée en exposant ceux-ci à différentes doses, allant de 0 à 6000 µJ/cm^2. La dose d'ultraviolets a été suivie grâce à une sonde située à l'intérieur de la chambre. Une valeur était enregistrée toutes les demi-secondes. La dose totale d'exposition a été obtenue en faisant la somme sous la courbe. La figure 21 illustre la dose d'UV en mW/cm^2 en fonction du temps en secondes. En faisant l'aire sous la courbe on obtient des valeurs de 3,18 et 3,51 mW s/cm^2.

En observant le graphique de la figure 22, le phage le plus sensible aux U.V. est phiX174, suivi de phi6. PR772 et MS2 ont une survie semblable. Les données ont été analysées avec une fonction de décroissance exponentielle à une phase (*exponential : one phase decay*). Le tableau 5 contient les valeurs des constantes K, qui est une constante de vitesse qui nous informe de la rapidité à laquelle le processus de perte d'infectivité se fait, exprimée en cm^2 µJ^{-1}, et R^2 qui indique la qualité de l'ajustement de la courbe (*goodness of fit*).

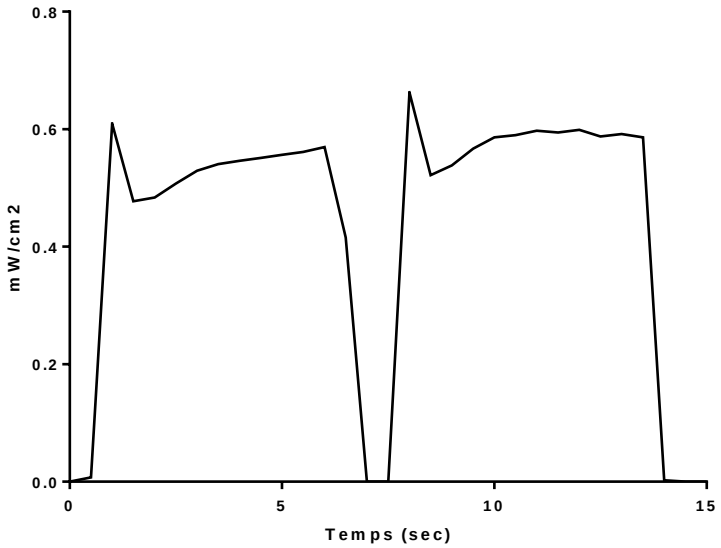


Figure 21: Exposition des phages aux U.V.

Tableau 5 : Constantes K et R^2 pour les quatre phages pour les expérimentations avec les UV

Phages	Constante K	Constante R^2
phiX174	0,00164	0,97
PR772	0,00041	0,90
phi6	0,00092	0,77
MS2	0,00055	0,95

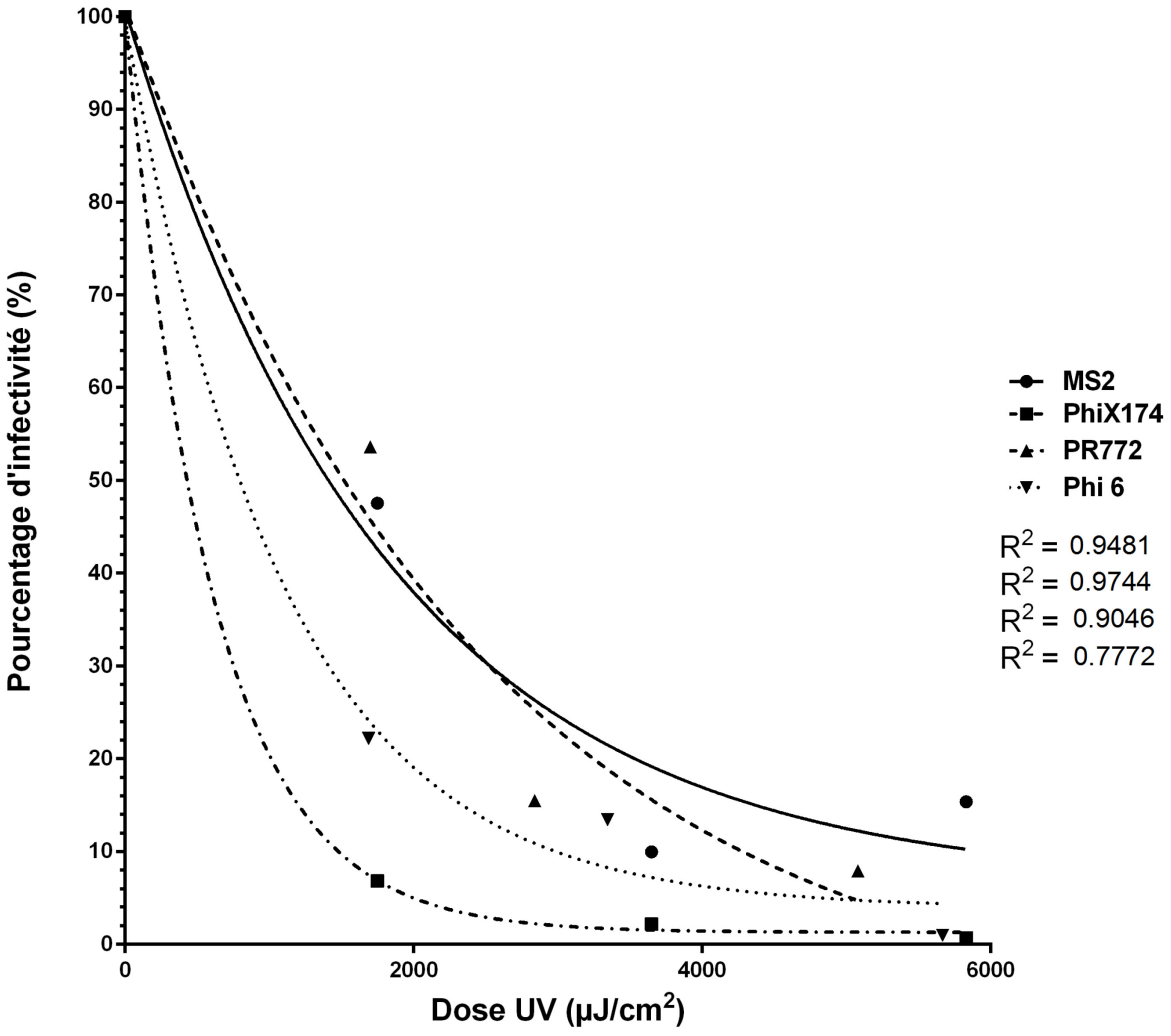


Figure 102: Pourcentage d'infectivité des quatre phages en fonction de la dose d'exposition aux UV.

3.5 Étude pilote : Validation des modèles avec un virus eucaryote

La validation des modèles a été faite en co-nébulisant ceux-ci en présence du virus de l'*Influenza*. Ce virus eucaryote était atténué et provenait du vaccin saisonnier *Flumist.* Le mélange des quatre phages avec l'*Influenza* a été exposé à 20 et 80% HR, à une température constante de 18°C, pour une période d'exposition de 0, 6 et 14 heures.

Les résultats présentés à la figure 23 illustrent l'évolution de l'infectivité de l'*Influenza* dans le temps à 20 et 80% HR. Les résultats sont rapportés au ratio d'infectivité de départ, expliquant un pourcentage de 100% au temps 0. Donc, pour une humidité relative de 20%, on observe une baisse de 90% de l'infectivité entre 0 et 6 heures, et une stabilité de l'infectivité par la suite. Pour une humidité relative de 80%, on observe une baisse de 99,6% de l'infectivité entre 0 et 6 heures, et une diminution beaucoup moins abrupte entre 6 et 14 heures. Ces expériences ont été faites en un réplicat, expliquant l'absence d'analyses statistiques et les résultats sont donc très préliminaires.

Lors de ces expériences, les phages ont répondu de la même manière que lors des expériences pour évaluation la résistance de ceux-ci à différentes humidités relatives (voir résultats figure 19), démontrant la validité de l'expérimentation (résultats non montrés).

Il a aussi été observé que le processus de nébulisation ne semble pas endommager le virus de l'*Influenza*, de même que le passage dans le système de la chambre environnementale. L'étape critique de la manipulation semble être l'échantillonnage, qui a été fait avec un SKC Biosampler®. Ce résultat a pu être obtenu par une expérience de Marie-Josée Toulouse (résultats non publiés). Elle a inoculé le liquide de collection d'un SKC Biosampler® avec de l'*Influenza*, et observé la même baisse d'infectivité que j'ai pu observer en faisant subir la nébulisation, l'exposition 0 heure et l'échantillonnage à l'*Influenza*.

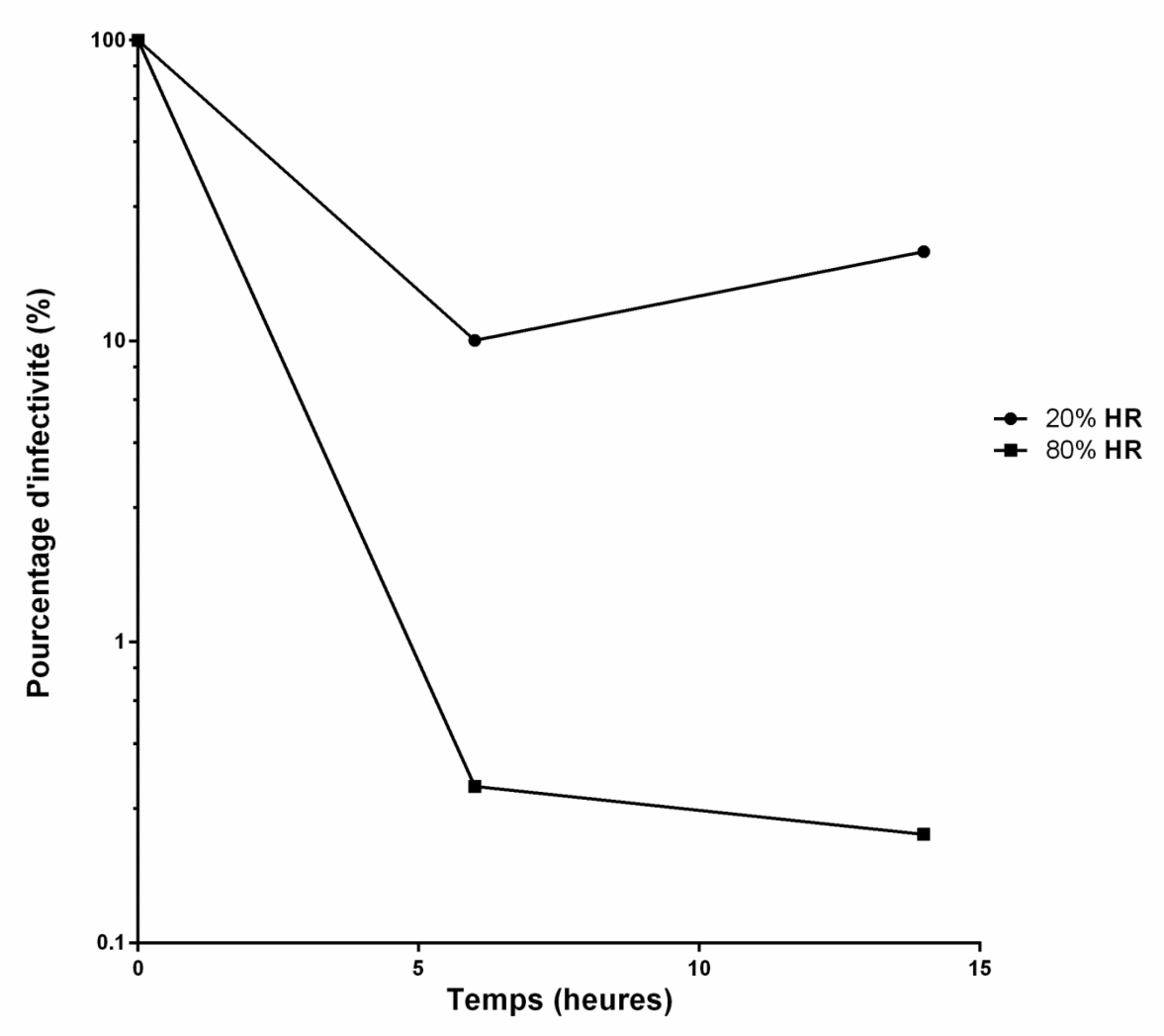


Figure 23: Pourcentage d'infectivité du virus de l'*Influenza* (*Flumist*) en fonction du temps à deux humidités relatives (20 et 80%).

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Évaluation de la performance de la CER

Depuis que Goldberg, en 1958, à proposer le premier modèle de chambre rotative [11], l'étude des stress environnementaux sur la survie des aérosols a pris son envol. En effet, avant cette avancée technologique, les temps d'exposition devaient être de très courtes durées pour empêcher la sédimentation des particules et par le fait même, leur perte sur les parois d'une quelconque chambre. Ces courts temps d'exposition ne pouvaient fournir que très peu d'informations sur l'effet que pouvaient avoir l'humidité, la température ou la présence de rayons ultraviolets par exemple. Afin d'étudier les effets à long terme de différentes conditions environnementales, le laboratoire de Caroline Duchaine a travaillé à la conception d'une de ces chambres. Cette dernière est arrivée dans nos installations à l'été 2011. Le premier objectif de ce projet était la mise en route et la caractérisation de ce prototype de chambre environnementale.

Une des premières étapes a été l'élaboration des montages expérimentaux. Dans le choix des matériaux, le diamètre extérieur, le diamètre intérieur, la souplesse (un matériau trop souple absorbe la pression et biaise la vitesse de nébulisation par exemple (communication personnelle, Nathalie Turgeon)) et la neutralité électrique (un matériel chargé électriquement peut attirer les particules et les faire impacter à sa surface), étaient des caractéristiques prises en considération.

Pour relier les tubes de dessicant entre eux, le cuivre a été choisi pour sa souplesse, en comparaison avec l'aluminium, car une courbe très prononcée devait être donnée aux tuyaux (figure en annexe dans le manuel d'instruction). C'est aussi un matériel relativement neutre et qui n'attire pas trop les particules. C'est une constatation qui a été faite par Nathalie Turgeon lors d'un stage chez

TSI. Pour la très grande majorité de la tubulure des autres montages (Collison, SKC Biosampler®, APS) un matériau de type *Tygon*® a été utilisé.

Il a ensuite été vérifié que la chambre était en mesure d'accomplir ses fonctions : modulation et maintien de la température, stabilité de la température en présence d'UV, étanchéité, maintien des particules en suspension et modulation de la vitesse.

Il a été démontré que la chambre pouvait atteindre des températures allant de 10°C à 45°C. Au-delà de 45°C, les risques de faire fondre les scellants servant à l'étanchéité sont trop élevés. Il a été impossible de descendre en deçà de 10°C, mais des modifications à la chambre pourraient être apportées telles qu'une meilleure isolation de la boîte de polycarbonate, l'ajout de plus de climatiseurs et, dans le cas d'une expérience de courte durée, l'ajout d'un banc de glace. Il a été possible de maintenir des températures de 18°C et 30°C pour des périodes de 24 heures avec des variations de moins de 0,5 °C. Il a aussi été démontré que la mise en marche de la lampe UV pour une courte période de temps, soit de moins de 5 minutes, n'avait pas d'effet sur le maintien de la température.

L'étanchéité de la chambre a été obtenue par l'ajout de scellant (*the Right Stuff*®) entre les pièces détachables, particulièrement entre le cylindre central et les extrémités maintenues par des loquets. La présence de fuites a d'abord été vérifiée de façon manuelle (sensation de vent sur les mains), et ensuite par la capacité de la chambre à maintenir une pression positive suite à la fermeture de tous les ports. Finalement, l'étanchéité était validée par la capacité à maintenir une humidité relative constante après fermeture de tous les ports. À 18°C, l'humidité relative diminue de 2,2% ± 0,2, 3,6 ± 0,4% et 3,3 ± 0,6% sur une période de 14 heures pour des humidités relatives initiales de 20%, 50% et 80% respectivement.

Il a finalement été vérifié que la chambre était en mesure d'accomplir sa principale tâche, celle de maintenir des particules en suspension sous l'effet de la

rotation. La chambre a été remplie d'aérosols, les ports ont été fermés et le nombre et la quantité de particules présentes ont été suivis sur une période de 5 heures avec un APS. L'expérience a été faite en présence et absence de rotation. Il a été démontré que la rotation était en mesure de garder un plus grand pourcentage de particules en suspension, 58% et 32% pour 1 rpm et 0 rpm respectivement. La baisse du nombre de particule peut-être due à la sédimentation de celles-ci sur les parois ou due à l'agglomération de plus petites particules ensemble. La capacité de la chambre à maintenir les particules en suspension a aussi été prouvée par le maintien du MMAD à 1 rpm. À 0 rpm, une décroissance était observée (1,28 µm à 0,96 µm) laissant croire à une perte des plus grosses particules par sédimentation.

L'efficacité des chambres rotatives a déjà été prouvée [2, 13, 14] et leur utilisation pour étudier l'effet des conditions environnementales sur les virus est bien documentée [15, 20, 57, 75, 118]. Les expérimentations et résultats décrits plus hauts ne viennent que confirmer le bon fonctionnement de notre système.

4.2 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes humidités relatives

Afin de vérifier l'effet de l'humidité relative sur nos quatre phages modèles, ils ont été nébulisés dans la CER à des humidités de 20, 50 et 80%. L'effet du temps a aussi pu être étudié par des temps d'exposition de 0, 6 et 14 heures à l'intérieur de la chambre.

Les phages phiX174 et PR772 sont significativement plus stables à hautes humidités ($p < 0,05$), le phage phi6 est plus stable à basses humidités ($p < 0,05$) et finalement, MS2 est stable à toutes les humidités. Phi6 a été particulièrement plus difficile à travailler que les autres, et les écarts-types plus élevés en sont la preuve. L'enveloppe lipidique de celui-ci pourrait faire qu'il a tendance à s'agglomérer (nature hydrophobe), et à former des amas. Cette caractéristique engendrerait plus

de variabilité dans le compte des plages de lyse, tout dépendant si une plage correspond à un amas de phages ou à un seul phage.

Le temps peut avoir un effet sur l'ensemble des phages, mais est particulièrement plus néfaste pour le phage PR772. De ce résultat on peut conclure que c'est probablement un phage qui aurait de la difficulté à faire de la transmission sur de longues distances, en raison du long temps de suspension nécessaire. De ce fait, PR772 serait peut-être un bon modèle pour les virus eucaryotes ayant cette même caractéristique.

MS2 est un particulièrement résistant. Il a une capside très étanche [119]. Il est régulièrement utilisé comme modèle de virus entérique pour l'évaluation des techniques de désinfection des surfaces ou de l'eau par exemple [120-122] en raison de sa grande résistance. Deux autres études ont aussi démontré une résistance de MS2 à toutes humidités à l'état d'aérosols, lorsque le mélange du nébuliseur contenait des peptones [20, 123]. Dans cette dernière étude, on a aussi étudié le phage phiX174 qui s'est avéré plus stable à hautes humidités, toujours en présence de peptones [123].

Selon Daugelavicius *et al*. [124] phi6 entre dans sa bactérie hôte par fusion de sa membrane à la membrane externe de *Pseudomonas syringae*. La protéine P3 attache phi6 au pilus et la protéine P6 sert à la fusion avec la membrane externe [124]. Tel que vu dans la section 1.2.3.3, l'humidité pourrait affecter l'infectivité des virus en modulant le pH des aérosols et induire des changements de conformation chez certaines protéines impliquées dans le processus infectieux. Il a aussi été mentionné que les virus entrant dans leur cellule hôte autrement que par fusion (ex : endocytose), ont moins tendance à être affectés par l'humidité. La réponse de phi6 à l'humidité ainsi que son mode d'entrée semble donc concorder.

4.3 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles à différentes températures

Afin de vérifier l'effet de la température sur la stabilité des phages modèles, ceux-ci ont été exposés à 18°C et 30°C à une humidité relative constante de 80%. Encore ici, l'effet du temps a été évalué par des temps d'exposition à ces conditions de 0, 6 et 14 heures.

Une élévation de la température a eu un effet significatif sur les phages phiX174 et MS2. On observe une baisse de 2 log et plus avec une augmentation de la température. PR772 ne semble pas affecté par la hausse de température. Aucun phage phi6 infectieux n'a été détecté à 30°C par culture, mais autant qu'à l'habitude en qPCR, démontrant que l'absence de détection n'est pas due à l'absence de phages.

Il est aussi intéressant de constater que pour les phages phiX174 et MS2, on observe exactement le même effet du temps, peu importe la température. Pour le phage PR772, le temps a sensiblement le même effet peu importe la température.

Phi6 détient une enzyme lytique thermosensible impliquée dans la pénétration du peptidoglycane [125]. La température élevée, en plus des autres stress (humidité élevée, non favorable à la stabilité de phi6), ont pu rendre cette enzyme inapte à infecter leur hôte.

MS2 et phiX174 se sont montrés particulièrement stables à 18°C et 80% d'humidité relative. De plus, MS2 est reconnu pour sa capside très étanche, le rendant plus résistant que la moyenne des virus. Une hausse de température a pourtant eu un effet significatif sur leur infectivité, mais le phage PR772, moins stable aux variations d'humidité, n'a pas été affecté. Une différence notable entre la composition de la capside de PR772 et les phages phiX174 et MS2, est la

présence de lipide dans l'épaisse membrane interne de PR772 [126]. La chaleur affecte les protéines en les dénaturant. En perdant leur structure, elles perdent aussi leur fonction. Dans le cas des virus, la dénaturation des protéines empêche souvent la reconnaissance de l'hôte et/ou son attachement. D'ailleurs, dans une étude sur l'effet de différentes méthodes de désinfection sur les virus présents dans l'eau, où on a utilisé MS2 comme modèle de virus, on a démontré que la chaleur affectait particulièrement l'attachement (voir figure 24) [127]. Dans une autre étude, on a étudié l'effet de la chaleur et du NaCl sur MS2 et Norovirus murin. On a démontré que la chaleur avait un plus grand effet sur l'infectivité de MS2 que le NaCl [128]. Il a été mentionné dans l'introduction que la concentration de NaCl varie dans un aérosol avec la modulation de l'humidité. Étant donné que MS2 semble moins affecté par le NaCl que par la chaleur, cela pourrait expliquer la plus grande perte d'infectivité avec une modulation de la température comparativement à une modulation de l'humidité.

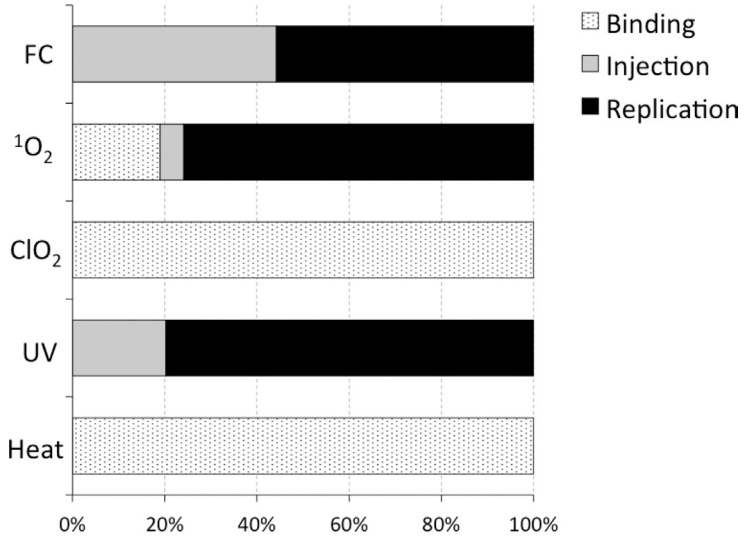


Figure 24: Contribution relative de l'attachement, l'injection et la réplication dans la perte d'infectivité, selon le mode de désinfection choisi. Lors de la désinfection par la chaleur, 100% de la perte d'infectivité est due à une altération au niveau de l'attachement à la cellule hôte. On remarque aussi que les UV ont influencé les étapes d'injection et de réplication de MS2. Dans cette étude, MS2 a été exposé à 72°C [127]. Figure tirée de [126]

PhiX174 semble être un phage, qui dans l'eau, est particulièrement résistant à la température. Il est même utilisé en cas de extrême dans les études de traitement des eaux usées [129]. À notre connaissance, aucune étude sur l'effet de la température sur les aérosols de phiX174 n'a été faite. Il se pourrait que la modulation de la température ait plus d'impact sur ce virus lorsqu'il est à l'état d'aérosols.

4.4 Évaluation de la résistance de quatre bactériophages modèles aux UV

Afin de vérifier l'effet des UV sur la stabilité des phages modèles, ceux-ci ont été exposés à différentes doses, allant de 0 à 6000 $\mu J/cm^2$. La température et l'humidité sont restées constantes, soit à 18°C et 20% d'humidité relative.

Une diminution de l'infectivité de l'ensemble des phages en fonction de l'augmentation de la dose d'UV a été observée. En ordre décroissant de résistance aux UV on retrouve : MS2>PR772>phi6>phiX174. MS2 a déjà prouvé sa plus grande résistance aux UV, entre autres dans des études sur le traitement des eaux usées, où il s'est montré de loin plus résistant que phiX174 [130] [131]. MS2 s'est aussi montré plus résistant que phix174 lorsqu'exposé à d'autres types de rayonnement, comme aux rayons gamma [132]. Une très grande sensibilité de phix174 aux UV a aussi été observée par d'autres chercheurs [133]. Il existe peu d'étude sur le phage PR772 et encore moins sur l'effet des UV sur son infectivité, mais le phage PRD1, qui a 97,2% de son génome identique à PR772 [89], s'est révélé deux fois moins résistant aux UV que MS2 sur une étude du traitement de l'eau aux UV [134].

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'effet des UV sur un virus : le type de virus, sa taille, ainsi que le type d'acide nucléique. La très grande résistance de MS2 aux UV peut s'expliquer par la très petite taille de son génome, soit seulement 3,57 kb. En effet, ce petit ARN est très compact, à cause de la

présence d'un très grand nombre de liens hydrogène [100], et de beaucoup de structures secondaires [100], ceci pouvant protéger les acides nucléiques des UV.

L'ADN serait possiblement plus sensible aux UV que l'ARN [135]. Ceci est peut-être dû au fait que les thymines font plus rapidement des dimères que l'uracile [136]. Selon nos résultats, PR772 (ADN double brin) se retrouve devant phi6 (ARN double brin), malgré le fait que l'ADN serait plus sensible aux UV. Phi6 s'est aussi avéré être plus variable que les autres phages dans sa réponse aux UV. Cette variabilité peut être due au fait que les géloses n'ont pas été mises assez rapidement à la noirceur pour empêcher la réparation du génome, catalysé par la lumière et que les enzymes réparatrices de la cellule hôte ont pu agir [97].

Selon la littérature, les doubles hélices d'ADN absorberaient moins que les génomes simple brin, les rendant moins sensibles aux UV [137]. C'est effectivement ce qui a été observé pour PR772 et phiX174.

En résumé, MS2 répond tel qu'attendu, c'est-à-dire qu'il est le plus résistant des phages testés, Phi6 se retrouve derrière PR772, alors qu'on aurait pu s'attendre à ce qu'il soit plus résistant en raison de son génome à ARN, et finalement phiX174 avec son génome simple brin ADN se retrouve dernier, tel qu'attendu selon la littérature.

4.5 Étude pilote : Validation des modèles avec virus eucaryote

La validation des modèles a été faite en co-nébulisant ceux-ci en présence du virus de l'*Influenza*. Ce virus eucaryote était atténué et provenait du vaccin saisonnier *Flumist.* Le mélange des quatre phages avec l'*Influenza* a été exposé à 20 et 80% HR, à une température constante de 18°C, pour une période d'exposition de 0, 6 et 14 heures.

Il est intéressant de constater que le *Flumist* réagit en plusieurs points comme le phage phi6, le seul phage enveloppé et à ARN segmenté de nos modèles. En effet, l'*Influenza* a eu une meilleure résistance à bas taux d'humidité. Cette corrélation entre un bas taux d'humidité et une meilleure résistance a aussi été observée par Lowen et Hemme [56, 112]. L'effet de l'humidité semble plus marqué à partir de 6 heures d'exposition tout comme phi6. De plus, on peut observer un effet du temps à 80% de HR sur le virus de l'*Influenza* tout comme on l'a noté pour le phage phi6. L'effet de la température n'a pas été testé dans la présente expérience pour le *Flumist*, mais Lowen a démontré que l'*Influenza* ne se transmet pas par aérosol à 30°C [68]. Phi6 a aussi démontré son incapacité à persister à 30°C lors de nos expériences. Il a cependant été observé que le *Flumist* semble plus résistant au processus de nébulisation que le phage phi6. Il ne faut pas oublier que ces virus sont différents en de nombreux points, entre autres la nature des membranes lipidiques des deux virus est différente. L'une provient de cellules de mammifère tandis que l'autre de paroi bactérienne.

Donc on voit qu'en plusieurs points phi6 semble pouvoir être le phage modèle pour l'*Influenza*, parmi les quatre testés dans notre projet. Il est évident, cependant, qu'il faut garder en tête qu'il s'agit de modèles et que leur rôle est de nous aider à mieux comprendre le comportement des virus dans l'air et nous aider à prédire la réponse exacte d'un virus eucaryote.

5. Conclusion et perspectives

Le projet avait pour but de développer des modèles pour mieux comprendre le comportement des virus dans l'air. Pour ce faire, nous avons sélectionné quatre phages en fonction des différences qu'ils présentaient au niveau de leur génome et de leur structure, afin de les associer au plus grand nombre de virus eucaryotes possible. En les exposant, sous forme d'aérosols, à différentes températures, humidités et au rayonnement des UV, il a été démontré que : 1) les phages non enveloppés semblent mieux persister à de haut taux d'humidité et que le phage enveloppé préfère de bas taux, 2) qu'une augmentation de la température diminue le taux de survie des phages enveloppés et empêche la détection de phages enveloppés infectieux, et 3) qu'une augmentation des UV diminue de façon exponentielle la quantité de phages infectieux.

Le plus intéressant des résultats est le fait que nos phages répondent tous de manière différente aux conditions environnementales auxquels ils ont été soumis. Cette variété de réponses en fait d'excellents modèles, car à eux quatre ils permettent l'approfondissement de la compréhension du comportement des virus dans l'air. Il serait intéressant de tester d'autres phages pour chacune des catégories testées (type de génome, enveloppé ou non). De plus, il pourrait être intéressant de vérifier si ce ne serait pas l'humidité absolue qui aurait un plus grand impact sur la persistance des virus dans l'air.

Ayant démontré leur potentiel en tant que modèle de virus eucaryote en laboratoire, la prochaine étape du projet sera de transférer nos expériences dans un milieu réel, telles qu'une salle de classe ou une chambre d'hôpital. Cela nous permettra de voir comment se déplacer et se comportent les virus lorsque soumis à d'autres facteurs tels que la ventilation et la présence d'humain.

Une autre suite du projet sera de tester l'effet de la présence de poussière sur le comportement des phages modèles, autant au niveau de leur déplacement (ex : sédimentation plus rapide), qu'au niveau de leur infectivité.

En somme, les résultats de ce projet ouvrent une multitude de portes à de nouvelles expériences. En se retrouvant avec quatre modèles qui répondent de manières différentes aux stress auxquels ils ont été soumis, on obtient un tableau très intéressant des comportements possibles des virus eucaryotes. On répond donc à l'objectif principal que nous nous étions donné : offrir à la communauté scientifique de meilleurs outils pour approfondir nos connaissances du comportement des virus dans l'air. Ces modèles étant non-pathogène pour l'homme, peu coûteux et relativement facile de manipulation, les expérimentations en seront allégées et surtout moins contraignantes.

Bibliographie

1. Verreault, D., S. Moineau, and C. Duchaine, *Methods for sampling of airborne viruses.* Microbiol Mol Biol Rev, 2008. 72(3): p. 413-44.
2. Goldberg, L.J., et al., *The use of a rotating drum for the study of aerosols over extended periods of time.* American Journal of Hygiene, 1958. 68(1).
3. Caroline Duchaine, L.T., Valérie Létourneau, *Bioaérosols et aérobiologie, MCB-6003*, U. Laval, Editor 2011: Québec. p. 33.
4. Wilson, J.C., *Aerosol Technology - Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles - Hinds,Wc.* American Scientist, 1983. 71(4): p. 430-431.
5. Xie, X., et al., *How far droplets can move in indoor environments - revisiting the Wells evaporation-falling curve.* Indoor Air, 2007. 17(3): p. 211-225.
6. Hogan, C.J., et al., *Sampling methodologies and dosage assessment techniques for submicrometre and ultrafine virus aerosol particles.* Journal of Applied Microbiology, 2005. 99(6): p. 1422-1434.
7. Hinds, W.C., *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles, second edition*. John Wiley and son ed1999. 483.
8. Roy, C.J. and D.K. Milton, *Airborne transmission of communicable infection - The elusive pathway.* New England Journal of Medicine, 2004. 350(17).
9. Prescott, L., J. Harley, and D. Klein, *Microbiologie*. de Boeck ed2003, Bruxelle: Mcgraw-Hill. 1137.
10. Evans, A.S. and R.A. Kaslow, *Viral infection of humans, Epidemiology and control*. Plenum Medical ed1997, New-York. 1081.
11. Marks, P.J., et al., *Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant.* Epidemiology and Infection, 2000. 124(3): p. 481-487.
12. Verreault, D., *Aerovirology and th detection of airborne viruses*, in *biochemistry and microbiology*2010, Laval: Quebec. p. 242.
13. Asgharian, B. and O.R. Moss, *Particle Suspension in a Rotating Drum Chamber When the Influence of Gravity and Rotation Are Both Significant.* Aerosol Science and Technology, 1992. 17(4): p. 263-277.
14. Gruel, R.L., C.R. Reid, and R.T. Allemann, *The Optimum Rate of Drum Rotation for Aerosol Aging.* Journal of Aerosol Science, 1987. 18(1): p. 17-22.
15. Barlow, D.F. and A.I. Donaldson, *Comparison of the aerosol stabilities of foot-and-mouth disease virus suspended in cell culture fluid or natural fluids.* J Gen Virol, 1973. 20(3): p. 311-8.
16. Donaldso.Ai, *Influence of relative humidity on aerosol stability of different strains of foot and mouth disease virus suspended in saliva.* Journal of General Virology, 1972. 15(APR): p. 25-&.
17. Akers, T.G., S. Bond, and L.J. Goldberg, *Effect of temperature and relative humidity on survival of airborne Columbia SK group viruses.* Appl Microbiol, 1966. 14(3): p. 361-4.
18. Ijaz, M.K., et al., *Development of methods to study the survival of airborne viruses.* J Virol Methods, 1987. 18(2-3): p. 87-106.
19. Ijaz, M.K., et al., *Studies on the survival of aerosolized bovine rotavirus (UK) and a murine rotavirus.* Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1994. 17(2): p. 91-8.
20. Dubovi, E.J. and T.G. Akers, *Airborne stability of tailless bacterial viruses S-13 and MS-2.* Appl Microbiol, 1970. 19(4): p. 624-8.
21. Songer, J.R., *Influence of relative humidity on survival of some airborne viruses.* Applied Microbiology, 1967. 15(1): p. 35-&.
22. Elizabeth, K. and S. Alexander, *Bacteriophages : biology and applications*. CRC press ed2005, Florida. 510.
23. Sattar, S.A., M.K. Ijaz, and C.P. Gerba, *Spread of viral infections by aerosols.* Critical Reviews in Environmental Control, 1987. 17(2): p. 89-131.

24. Bloom, B.L., *The Medical Model, Miasma Theory, and Community Mental-Health.* Community Mental Health Journal, 1965. 1(4): p. 333-338.
25. JM., E., *The changing assessments of John Snow's and William Farr's cholera studies.* Soz Praventivmed, 2001. 46: p. 225-232.
26. Yu, I.T.S., et al., *Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus.* New England Journal of Medicine, 2004. 350(17): p. 1731-1739.
27. Atkinson, M.P. and L.M. Wein, *Quantifying the routes of transmission for pandemic influenza.* Bulletin of Mathematical Biology, 2008. 70(3): p. 820-867.
28. publique, S.d.l.f., *Infections associées aux soins de santé*, 2009. p. 39.
29. Fernstrom, A. and M. Goldblatt, *Aerobiology and its role in the transmission of infectious diseases.* J Pathog, 2013. 2013: p. 493960.
30. Horsfall, F.L., *Viral and rickettsial infections of man*. Viral and rickettsial infections of man, ed. T. Igor1965. 4th ed. xvi+1282p. Illus.-4th ed. xvi+1282p. Illus.
31. Steinhauer DA, H.J., *Rapid evolution of RNA viruses.* Annu. Rev. Microbiol. , 1987. 41: p. 409-433.
32. Tang, J.W., et al., *Factors involved in the aerosol transmission of infection and control of ventilation in healthcare premises.* Journal of Hospital Infection, 2006. 64(2): p. 100-114.
33. Knight, V., *Viruses as agents of airborne contagion.* Annals of the New York Academy of Sciences, 1980. 353: p. 147-56.
34. Edwards, D.A., et al., *Inhaling to mitigate exhaled bioaerosols.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. 101(50): p. 17383-17388.
35. GL Mandell, R.D.J., JE Bennett (Eds.), *Principles and practices of infectious diseases.* . 3 ed1990, New York: Churchill Livingston.
36. Cox., C.S., *The aerobiological pathway of microorganisms*1987, New York: Wiley. 293.
37. Chikasue, K., et al., *Detection of Torque Teno Virus DNA in Exhaled Breath by Polymerase Chain Reaction.* Acta Medica Okayama, 2012. 66(5): p. 387-397.
38. Xu, Z., et al., *Molecular and microscopic analysis of bacteria and viruses in exhaled breath collected using a simple impaction and condensing method.* PloS one, 2012. 7(7).
39. Eames, I., et al., *Airborne transmission of disease in hospitals.* J R Soc Interface, 2009. 6 Suppl 6: p. S697-702.
40. Beggs, C.B., *The airborne transmission of infection in hospital buildings: Fact or fiction?* Indoor and Built Environment, 2003. 12(1-2): p. 9-18.
41. Bischoff, W.E.R., T. ;Russell, G. B. ;Peters, T. R., *Transocular Entry of Seasonal Influenza-Attenuated Virus Aerosols and the Efficacy of N95 Respirators, Surgical Masks, and Eye Protection in Humans.* Journal of Infectious Diseases, 2011. 204(2): p. 193-199.
42. Tseng, C.C., L.Y. Chang, and C.S. Li, *Detection of Airborne Viruses in a Pediatrics Department Measured Using Real-Time qPCR Coupled to an Air-Sampling Filter Method.* Journal of Environmental Health, 2010. 73(4): p. 22-28.
43. Blachere, F.M., et al., *Measurement of Airborne Influenza Virus in a Hospital Emergency Department.* Clinical Infectious Diseases, 2009. 48(4): p. 438-440.
44. Xiao, W.J., et al., *[Detection of SARS-CoV and RNA on aerosol samples from SARS-patients admitted to hospital].* Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi, 2004. 25(10): p. 882-5.
45. Fabian, P., et al., *Influenza Virus in Human Exhaled Breath: An Observational Study.* PLoS ONE, 2008. 3(7).
46. Booth, T.F., et al., *Detection of airborne severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and environmental contamination in SARS outbreak units.* J Infect Dis, 2005. 191(9): p. 1472-7.
47. Myatt, T.A., et al., *Airborne rhinovirus detection and effect of ultraviolet irradiation on detection by a semi-nested RT-PCR assay.* Bmc Public Health, 2003. 3.
48. Myatt, T.A., et al., *Detection of airborne rhinovirus and its relation to outdoor air supply in office environments.* Am J Respir Crit Care Med, 2004. 169(11): p. 1187-90.

49. Sawyer, M.H., et al., *Detection of varicella-zoster virus DNA in air samples from hospital rooms.* J Infect Dis, 1994. 169(1): p. 91-4.
50. Suzuki, K., et al., *Detection of varicella-zoster virus DNA in throat swabs of patients with herpes zoster and on air purifier filters.* J Med Virol, 2002. 66(4): p. 567-70.
51. Yu, I.T.S., et al., *Temporal-spatial analysis of severe acute respiratory syndrome among hospital inpatients.* Clinical Infectious Diseases, 2005. 40(9): p. 1237-1243.
52. Donaldson, A.I. and S. Alexandersen, *Predicting the spread of foot and mouth disease by airborne virus.* Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties, 2002. 21(3): p. 569-575.
53. Moser, M.R., et al., *Outbreak of influenza aboard a commercial airliner.* American Journal of Epidemiology, 1979. 110(1): p. 1-6.
54. Sawyer, L.A., et al., *25-Nm to 30-Nm Virus Particle Associated with a Hospital Outbreak of Acute Gastroenteritis with Evidence for Airborne Transmission.* American Journal of Epidemiology, 1988. 127(6): p. 1261-1271.
55. Kimura, H., et al., *A norovirus outbreak associated with environmental contamination at a hotel.* Epidemiology and Infection, 2011. 139(2): p. 317-325.
56. Hemmes, J.H., K.C. Winkler, and S.M. Kool, *Virus survival as a seasonal factor in influenza and poliomyelitis.* Nature, 1960. 188(4748): p. 430-431.
57. Karim, Y.G., et al., *Effect of relative humidity on the airborne survival of rhinovirus-14.* Can J Microbiol, 1985. 31(11): p. 1058-61.
58. Arundel, A.V., et al., *Indirect health effects of relative humidity in indoor environments.* Environ Health Perspect, 1986. 65: p. 351-61.
59. Benbough, J.E., *Some factors affecting the survival of airborne viruses.* J Gen Virol, 1971. 10(3): p. 209-20.
60. Shaman, J. and M. Kohn, *Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(9): p. 3243-8.
61. Donaldson, A.I. and N.P. Ferris, *Survival of Some Air-Borne Animal Viruses in Relation to Relative Humidity.* Vet Microbiol, 1976. 1(4): p. 413-420.
62. Yang, W. and L.C. Marr, *Mechanisms by which ambient humidity may affect viruses in aerosols.* Appl Environ Microbiol, 2012. 78(19): p. 6781-8.
63. Tang, J.W., *The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents.* J R Soc Interface, 2009. 6 Suppl 6: p. S737-46.
64. Harper, G.J., *Airborne Micro-Organisms - Survival Tests with 4 Viruses.* Journal of Hygiene, 1961. 59(4): p. 479-&.
65. Ehrlich, R. and S. Miller, *Effect of relative humidity and temperature on airborne Venezuelan equine encephalitis virus.* Appl Microbiol, 1971. 22(2): p. 194-9.
66. Zimmerman, J., et al., *Effect of temperature and relative humidity on the stability of infectious porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols.* Veterinary Research, 2007. 38(1): p. 81-93.
67. Ijaz, M.K., et al., *Survival Characteristics of Airborne Human Coronavirus-229e.* Journal of General Virology, 1985. 66: p. 2743-2748.
68. Lowen, A.C., et al., *High temperature (30 degrees C) blocks aerosol but not contact transmission of influenza virus.* J Virol, 2008. 82(11): p. 5650-5652.
69. Larry, S. and C. Wendy, *Molecular genetics of bacteria, Third edition.* ASM press ed2007, Washington. 735.
70. Ko, G. and C.M. Walker, *Effect of ultraviolet germicidal irradiation on viral aerosols.* Environmental Science & Technology, 2007. 41(15): p. 5460-5465.
71. Ko, G., M.W. First, and H.A. Burge, *Influence of relative humidity on particle size and UV sensitivity of Serratia marcescens and Mycobacterium bovis BCG aerosols.* Tubercle and Lung Disease, 2000. 80(4-5): p. 217-228.

72. Riley, R.L. and J.E. Kaufman, *Effect of relative humidity on the inactivation of airborne Serratia marcescens by ultraviolet radiation.* Appl Microbiol, 1972. 23(6): p. 1113-20.
73. McDevitt, J.J., et al., *Characterization of UVC light sensitivity of vaccinia virus.* Appl Environ Microbiol, 2007. 73(18): p. 5760-6.
74. de Jong, J.C., M. Harmsen, and T. Trouwborst, *Factors in the inactivation of Encephalomyocarditis virus in aerosols.* Infection and Immunity, 1975. 12(1): p. 29-35.
75. Elazhary, M. and J.B. Derbyshire, *Effect of temperature, relative humidity and medium on the aerosol stability of infectious bovine-rhinotracheitis.* Canadian Journal of Comparative Medicine-Revue Canadienne De Medecine Comparee, 1979. 43(2): p. 158-167.
76. Ijaz, M.K., *Studies on the airborne survival of rotavirus and human coronavirus*, 1985, University of Ottawa: Ottawa, Canada.
77. Willeke, K., X.J. Lin, and S.A. Grinshpun, *Improved aerosol collection by combined impaction and centrifugal motion.* Aerosol Science and Technology, 1998. 28(5): p. 439-456.
78. Duchaine, C., et al., *Comparison of Polycarbonate and Polytetrafluoroethylene Filters for Sampling of Airborne Bacteriophages.* Aerosol Science and Technology, 2010. 44(3): p. 197-201.
79. Yao, M.S., Y. Wu, and F.X. Shen, *Use of gelatin filter and BioSampler in detecting airborne H5N1 nucleotides, bacteria and allergens.* Journal of Aerosol Science, 2010. 41(9): p. 869-879.
80. Clark Burton, N., S.A. Grinshpun, and T. Reponen, *Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses.* Annals of Occupational Hygiene, 2007. 51(2): p. 143-151.
81. Blachere, F.M., et al., *Bioaerosol sampling for the detection of aerosolized influenza virus.* Influenza and Other Respiratory Viruses, 2007. 1(3): p. 113-120.
82. Henningson, E.W. and M.S. Ahlberg, *Evaluation of Microbiological Aerosol Samplers - a Review.* Journal of Aerosol Science, 1994. 25(8): p. 1459-1492.
83. Zimmerman, J.J., et al., *Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus.* Applied and Environmental Microbiology, 2006. 72(7): p. 4811-4818.
84. Ackermann, H.W., *5500 Phages examined in the electron microscope.* Archives of Virology, 2007. 152(2): p. 227-243.
85. Grabow, W.O.K., *Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water.* Water Sa, 2001. 27(2): p. 251-268.
86. Laurila MR, S.P., Stuart Dl, Grimes JM, Bamford DH, *Back-priming mode of phi6 RNA-dependent RNA polymerase.* J Gen Virol., 2005. 86: p. 521-526.
87. Ehrlich, R., S. Miller, and L.S. Idoine, *Effects of environnemental factors on survival of airborne T-3 coliphage.* Applied Microbiology, 1964. 12(6).
88. Coetzee, J.N., et al., *Properties of r-plasmid-r772 and the corresponding oilus-specific phage PR772.* Journal of General Microbiology, 1979. 110(FEB).
89. Lute, S., et al., *Characterization of coliphage PR772 and evaluation of its use for virus filter performance testing.* Appl Environ Microbiol, 2004. 70(8): p. 4864-71.
90. McAlister, M., H. Aranha, and R. Larson, *Use of bacteriophages as surrogates for mammalian viruses*, in *Pda/Emea European Virus Safety Forum*, J.S. Robertson, Editor 2004, Karger: Basel. p. 89-98.
91. Oshima, K.H., T.T. Evans-Strickfaden, and A.K. Highsmith, *Comparison of filtration properties of hepatitis B virus, hepatitis C virus and simian virus 40 using a polyvinylidene fluoride membrane filter.* Vox Sanguinis, 1998. 75(3): p. 181-188.
92. Vidaver, A.K., R.K. Koski, and J.L. Ven Etten, *Bacteriophage Phi-6 a lipid containing virus of pseudomonas-phaseolicola.* J Virol, 1973. 11(5): p. 799-805.
93. Tseng, C.-C. and C.-S. Li, *Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols.* Journal of Aerosol Science, 2005. 36(5-6): p. 593-607.
94. Gendron, L., et al., *Evaluation of Filters for the Sampling and Quantification of RNA Phage Aerosols.* Aerosol Science and Technology, 2010. 44(10): p. 893-901.

95. Phillpotts, R.J., et al., *The Cystovirus phi6 as a simulant for Venezuelan equine encephalitis virus.* Aerobiologia, 2010. 26(4): p. 301-309.
96. Tseng, C.-C. and C.-S. Li, *Inactivation of Virus-Containing Aerosols by Ultraviolet Germicidal Irradiation.* Aerosol Science and Technology, 2005. 39(12): p. 1136-1142.
97. Tseng, C.-C. and C.-S. Li, *Ozone for inactivation of aerosolized bacteriophages.* Aerosol Science and Technology, 2006. 40(9): p. 683-689.
98. Michel, A., et al., *Bacteriophage PhiX174's Ecological Niche and the Flexibility of Its Escherichia coli Lipopolysaccharide Receptor.* Appl Environ Microbiol, 2010. 76(21): p. 7310-7313.
99. van Duin J, T.N., *The Bacteriophages*. second ed2006, New York: Oxford University Press. 768.
100. Strauss, J.H. and R.L. Sinsheimer, *Purification and properties of bacteriophage MS2 and its ribonucleic acid.* Journal of Molecular Biology, 1963. 7(1): p. 43-&.
101. Trouwbor.T and J.C. Dejong, *Interaction of some factors in mechanism of inactivation of bacteriophage-MS2 in aerosols.* Applied Microbiology, 1973. 26(3): p. 252-257.
102. Griffiths, W.D., et al., *Determining the performance of a commercial air purification system for reducing airborne contamination using model micro-organisms: a new test methodology.* Journal of Hospital Infection, 2005. 61(3): p. 242-247.
103. Barker, J. and M.V. Jones, *The potential spread of infection caused by aerosol contamination of surfaces after flushing a domestic toilet.* J Appl Microbiol, 2005. 99(2): p. 339-347.
104. Moselio Schaechter, G.M., Barry I. Eisenstein, *Mechanisms of Microbial Disease*. second ed1993, États Unies: Williams and Wilkins. 973.
105. Sorrell, E.M., et al., *Predicting 'airborne' influenza viruses: (trans-) mission impossible?* Curr Opin Virol, 2011. 1(6): p. 635-42.
106. Brankston, G., et al., *Transmission of influenza A in human beings.* Lancet Infectious Diseases, 2007. 7(4): p. 257-265.
107. Lindsley, W.G., et al., *Quantity and Size Distribution of Cough-Generated Aerosol Particles Produced by Influenza Patients During and After Illness.* J Occup Environ Hyg, 2012. 9(7): p. 443-449.
108. Tellier, R., *Review of aerosol transmission of influenza A virus.* Emerg Infect Dis, 2006. 12(11): p. 1657-1662.
109. Alford, R.H., et al., *Human influenza resulting from aerosol inhalation.* Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1966. 122(3): p. 800-&.
110. Riley, R.L., *Airborn infection.* American Journal of Medicine, 1974. 57(3): p. 466-475.
111. Weber, T.P. and N.I. Stilianakis, *Inactivation of influenza A viruses in the environment and modes of transmission: A critical review.* Journal of Infection, 2008. 57(5): p. 361-373.
112. Lowen, A.C., et al., *Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature.* Plos Pathogens, 2007. 3(10): p. 1470-1476.
113. Schaffer, F.L., M.E. Soergel, and D.C. Straube, *Survival of airborne influenza-virus-effects of propagating host, relative humidity and composition of spray fluids.* Archives of Virology, 1976. 51(4): p. 263-273.
114. Myatt, T.A., et al., *Modeling the airborne survival of influenza virus in a residential setting: the impacts of home humidification.* Environmental Health, 2010. 9.
115. Shaman, J., et al., *Absolute humidity and the seasonal onset of influenza in the continental United States.* PLoS Biol, 2010. 8(2): p. e1000316.
116. Adams, M.H. and et al., *Bacteriophages*. Bacteriophages1959, New York: Interscience Publishers. 592.
117. Verreault, D., et al., *Comparison of Polycarbonate and Polytetrafluoroethylene Filters for Sampling of Airborne Bacteriophages.* Aerosol Science and Technology, 2010. 44(3): p. 197-201.
118. Ijaz, M.K., et al., *Comparison of the airborne survival pf calf rotavirus and poliovirus type-1 (sabin) aerosolized as a mixture.* Applied and Environmental Microbiology, 1985. 49(2).

119. Hoelzer K, F.W., Pouillot R, Van Doren JM, Dennis S., *Virus inactivation on hard surfaces or in suspension by chemical disinfectants: systematic review and meta-analysis of norovirus surrogates.* J Food Prot., 2013. 6: p. 928-1108.
120. Dawson, D.J., et al., *Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus.* J Appl Microbiol, 2005. 98(1): p. 203-209.
121. Huertas, A., et al., *Evaluation of Bacillus subtilis and coliphage MS2 as indicators of advanced water treatment efficiency.* Water Science and Technology, 2003. 47(3): p. 255-259.
122. Park, G.W. and M.D. Sobsey, *Simultaneous Comparison of Murine Norovirus, Feline Calicivirus, Coliphage MS2, and GII.4 Norovirus to Evaluate the Efficacy of Sodium Hypochlorite Against Human Norovirus on a Fecally Soiled Stainless Steel Surface.* Foodborne Pathogens and Disease, 2011. 8(9): p. 1005-1010.
123. Dubovi, E.J., *Biological activity of nucleic acid extracted from 2 aerosolized bacterial viruses.* Applied Microbiology, 1971. 21(4): p. 761-&.
124. Daugelavicius, R., et al., *Penetration of enveloped double-stranded RNA bacteriophages phi 13 and phi 6 into Pseudomonas syringae cells.* J Virol, 2005. 79(8): p. 5017-5026.
125. Caldentey, J. and D.H. Bamford, *The Lytic Enzyme of the Pseudomonas Phage Phi-6 - Purification and Biochemical-Characterization.* Biochimica Et Biophysica Acta, 1992. 1159(1): p. 44-50.
126. Coetzee, J.N., et al., *Properties of R plasmid R772 and the corresponding pilus-specific phage PR772.* J Gen Microbiol, 1979. 110(2): p. 263-73.
127. Wigginton, K.R., et al., *Virus Inactivation Mechanisms: Impact of Disinfectants on Virus Function and Structural Integrity.* Environmental Science & Technology, 2012. 46(21): p. 12069-12078.
128. Seo, K., et al., *Effect of Temperature, pH, and NaCl on the Inactivation Kinetics of Murine Norovirus.* Journal of Food Protection, 2012. 75(3): p. 533-540.
129. Bertrand, I., et al., *The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review.* J Appl Microbiol, 2012. 112(6): p. 1059-1074.
130. Battigelli, D.A., M.D. Sobsey, and D.C. Lobe, *The Inactivation of Hepatitis a Virus and Other Model Viruses by Uv Irradiation.* Water Science and Technology, 1993. 27(3-4): p. 339-342.
131. Timchak, E. and V. Gitis, *A combined degradation of dyes and inactivation of viruses by UV and UV/H2O2.* Chemical Engineering Journal, 2012. 192: p. 164-170.
132. Chen, Z.-B., H.-Y. Huang, and C.-W. Zhang, *Comparative study of the resistance of bacteriophageT4, PhiX174D, MS2 and f2 to gamma radiation.* Zhonghua yi xue za zhi, 2008. 88(3): p. 198-201.
133. Furuse, K. and I. Watanabe, *Effects of ultraviolet light (UV) irradiation on RNA pahge in H2O and in D2O.* Virology, 1971. 46(1): p. 171-&.
134. Meng, Q.S. and C.P. Gerba, *Comparative inactivation of enteric adenoviruses, poliovirus and coliphages by ultraviolet irradiation.* Water Research, 1996. 30(11): p. 2665-2668.
135. Rauth, A.M., *Physical State of Viral Nucleic Acid and Sensitivity of Viruses to Ultraviolet Light.* Biophysical Journal, 1965. 5(3): p. 257-&.
136. Jagger, J., *Introduction to research in ultraviolet photobiology*. Introduction to research in ultraviolet photobiology1967: Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J. x+164p. Illus.
137. Patrick, M.H. and R.O. Rahn, *Photochemistry of DNA and polynucleotides photo products*. Wang, Shih Yi1976. 35-95.

Annexe

Manuel d’utilisation de la chambre environnementale

Manuel d'utilisation de la chambre environnementale rotative (rotating drum)

Pierre Lasou
Université Laval (Bibliothèque)

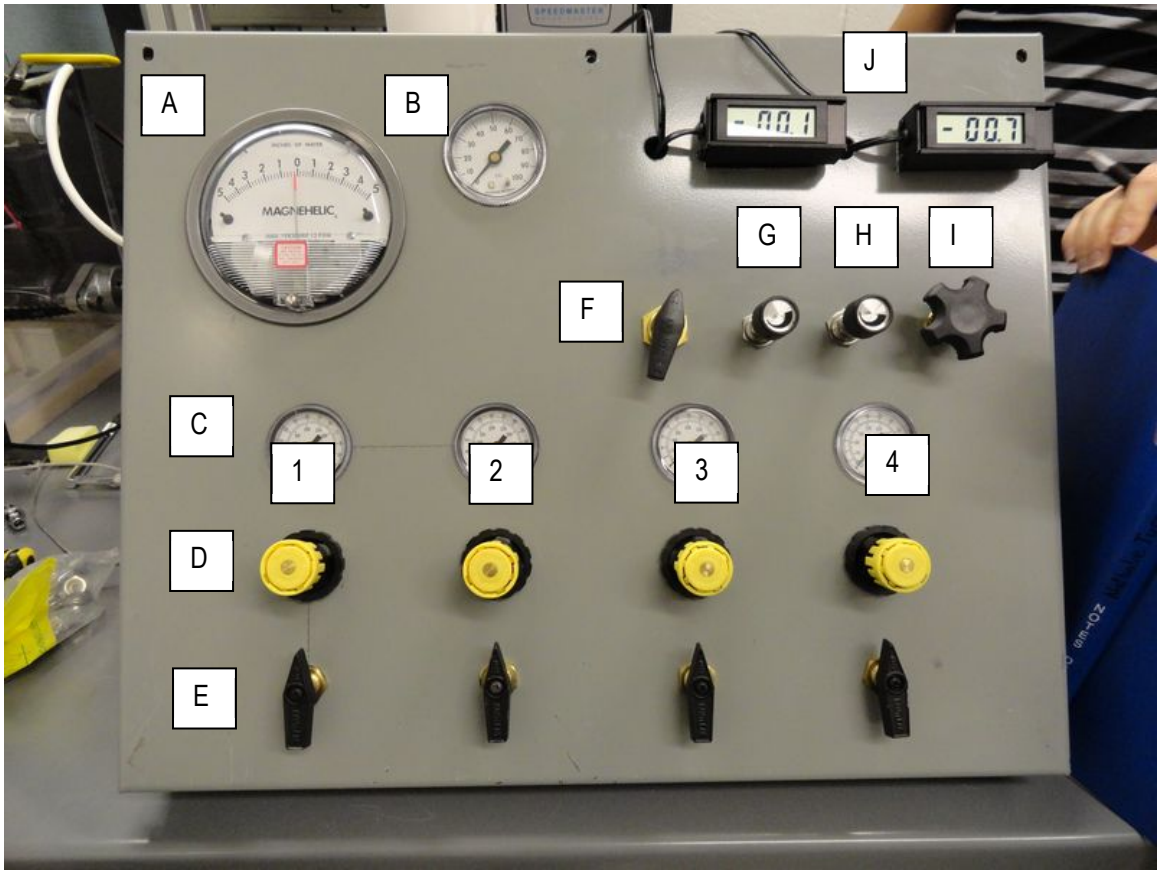
Table des matières

Composantes 87
Le panneau de contrôle 87
Moteur : 89
Lampe U.V 90
Contrôle de la température 92
Tubes de dessicants 94
Sondes de température 95
Montages possibles 96
Collison 96
Aeroneb 96
Biosampler® 97
APS 97
Filtre HEPA 97
Humidificateur de la chambre environnementale 98
Supports pour le drum 99
Trouble shooting 101
Il n'y a rien qui allume 101
Fuites 101
Eau dans le drum 101
Stabilité température et humidité 102
La sonde Kilog ne fonctionne plus 102
Pas de particule dans le drum 102
Nombre plus bas de particules qu'à l'habitude 102
Mousse dans nébuliseur 102

Cette chambre environnementale a été conçue pour l'étude du vieillissement des aérosols et les effets sur leur infectivité. On peut y moduler plusieurs paramètres dont : la température, l'humidité relative, la vitesse de rotation et la présence d'UV La chambre a un volume de 55 litres et présente l'avantage de pouvoir tourner indépendamment de ses ports d'échantillonnage, ce qui permet d'échantillonner tout en continuant à faire tourner la chambre. La section qui suit décrit en détail les différentes parties de la chambre.

Composantes

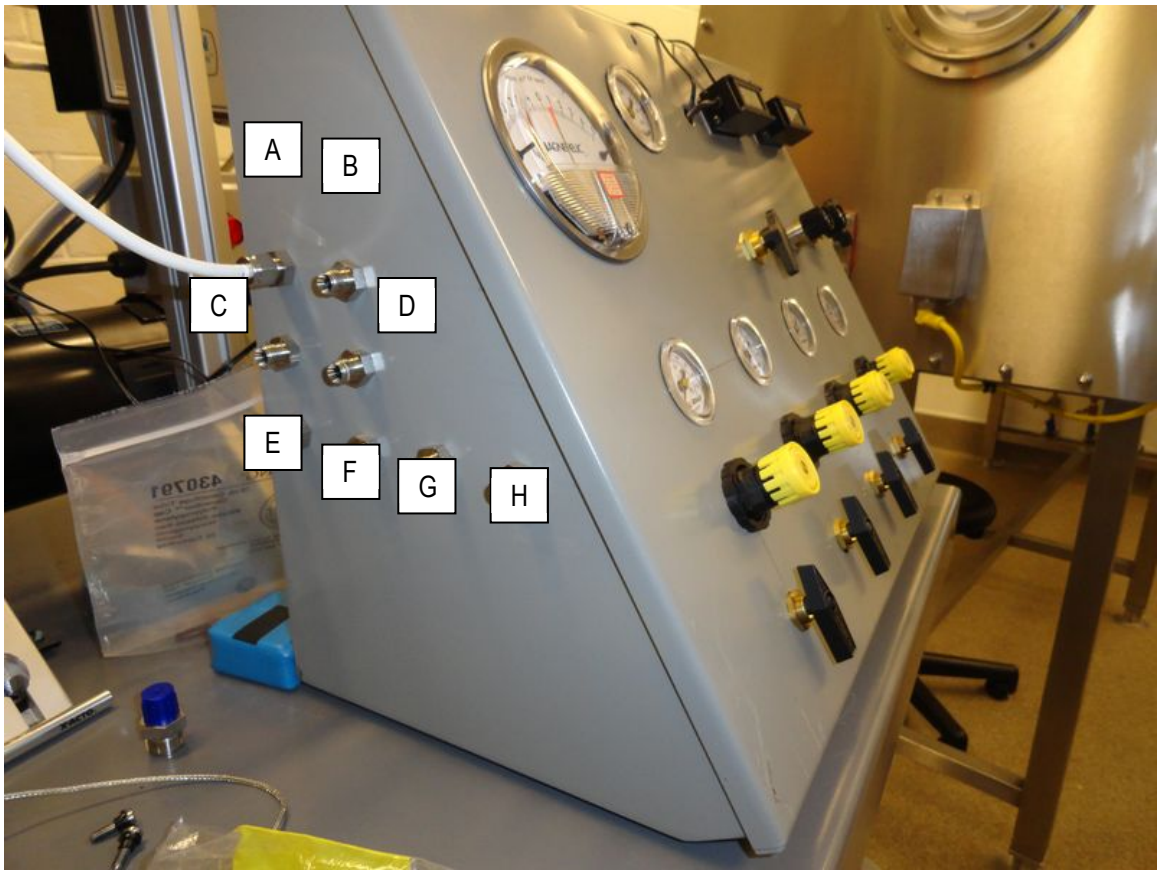
Le panneau de contrôle



	Description
A	Ce cadran indique la pression à l'intérieur du drum. Cela est possible grâce au tuyau blanc qui relie le panneau de contrôle à la chambre. Lors de la nébulisation l'aiguille va vers les positifs (droite) et lors de l'échantillonnage elle va vers les négatifs (gauche). Il est important de vérifier ce cadran lors des expérimentations, des pressions trop élevées vont mener à des fuites, à un bris du filtre HEPA ou à l'expulsion des bouchons de silicone.
B	Ce cadran indique la pression de l'air médicale. Lorsqu'aucun port n'est ouvert, elle indique environ 52 PSI. Si des ports sont en fonction, elle indiquera 52 – la pression d'air utilisée par le nébuliseur.
C	Ces 4 cadrans indiquent la pression de l'air médicale dans chacun des ports.
D	Avec ces valves on peut ajuster la pression voulue dans chacun des ports.
E	Ce sont des valves on/off pour faire entrer l'air médical dans les ports.
F	Cette valve permet de changer le mode de fonctionnement du port 3. En effet, il peut soit fonctionner avec la pression de l'air ou avec le débit de l'air. Lorsque la flèche pointe vers le haut, il fonctionne par pression, et lorsqu'elle pointe vers le bas il fonctionne par débit d'air.

G	Il s'agit d'une needle valve pour l'ajustement de débit de l'air du port 3. Lorsqu'en fonction, on peut lire le débit sur le débitmètre situé juste au-dessus.
H	Le port 4 ne fonctionne que par débit d'air. La needle valve H est plus sensible que la I. Le débitmètre situé au-dessus indique la somme des deux valves.
I	Needle valve.
J	Débitmètre.

Le port restant à l'extrémité droite peut être utilisé pour le vide.



Ports	**Description**
A	Relié à la chambre rotative pour la pression.
B	Port qui ne doit JAMAIS être branché. Permet d'éviter l'explosion du panneau de contrôle si jamais la pression augmentait.
C	Port 4A, fonctionne par débit d'air.
D	Port 4B fonctionne par débit d'air.
E	Port 1 fonctionne par pression d'air.
F	Port 2 fonctionne par pression d'air.
G	Port 3A fonctionne par pression d'air.
H	Port 3B fonctionne par débit d'air.

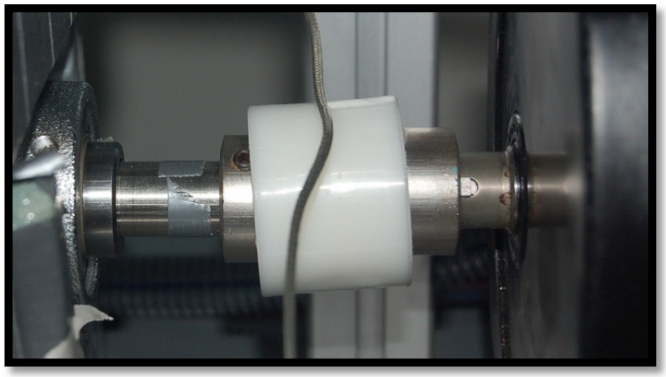
Moteur

Panneau de contrôle du moteur

Au maximum de sa vitesse, le moteur peut faire tourner la chambre à 1 rpm. Cependant, le moteur peut être modifié pour augmenter sa vitesse. On contrôle la vitesse à l'aide de l'interface sur la photo de gauche.

Il est primordial que le speed soit à 0 avant d'allumer le bouton *POWER*. Il faut aussi que le *POWER* soit à *OFF* avant d'allumer la barre d'alimentation.

En date de février 2012, le moteur fait beaucoup de bruit lorsqu'il fonctionne. Il s'agit peut-être des balais de charbon qui frottent ensemble, car le *drum* ne tourne pas assez vite comparé à ce qu'il pourrait faire. Le bruit pourrait aussi provenir de la rotation de la fane, mais somme toute, il n'y a pas à s'inquiéter pour le moment. Lorsque le moteur sera à changer, Daniel Verreault propose un moteur moins puissant.



Lien entre moteur et engrenage

Il est aussi très important de souvent jeter un coup d'œil au *shaft* qui relie le moteur à la chambre environnementale. S'il devait se bloquer, cela pourrait faire énormément de dégâts! Donc, vérifier qu'il tourne bien, que l'engrenage de plastique (voir photo) reste bien en place lorsqu'on le bouge légèrement de gauche à droite, que les dents de l'engrenage sont bien emboîtées dans la chaîne par exemple.

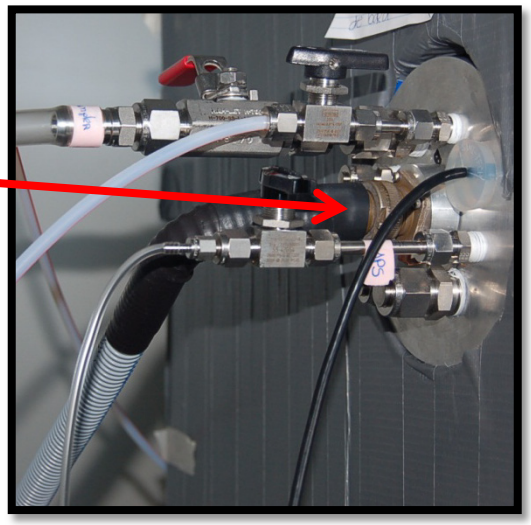
Engrenage-Chaîne

Pour sortir le *drum* de sa boîte il faut défaire la chaîne qui le relie à l'engrenage. Il suffit de faire tourner le drum jusqu'à ce qu'on aperçoive une goupille, telle que sur la photo. Il s'agit de l'endroit où la chaîne est coupée en deux. Il ne reste qu'à enlever la goupille avec des pinces pour pouvoir enlever la chaine.

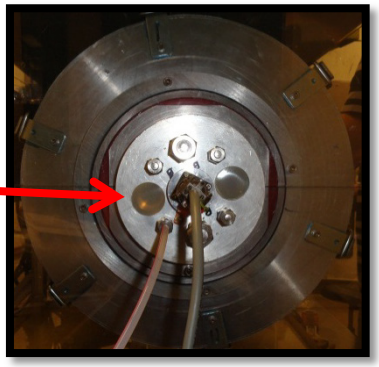
Lampe UV

Le contrôle des U. est très simple. Il suffit de mettre le bouton à ON ou OFF. Avant d'allumer les UV il est préférable d'attendre que les aérosols ce soient stabilisés. La lampe UV se situe à l'intérieur de la chambre, du côté gauche. Il est possible de la retirer très facilement simplement en tirant doucement dessus. Lorsqu'elle n'est pas en position, il faut mettre quelque chose, par exemple un carré de ruban électrique, pour protéger la prise électrique des aérosols.

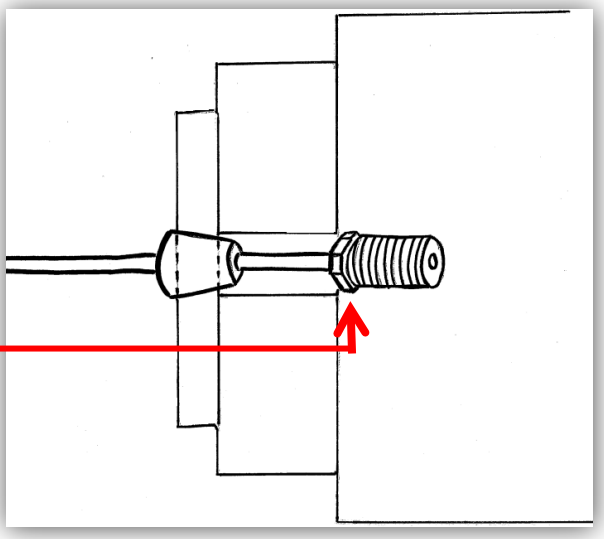
Pour installer la lampe UV dans le *drum*, il suffit simplement de la brancher à la prise prévue à cet effet à l'intérieur (4 trous pour les 4 dents de la lampe), et de ne pas oublier de la brancher aussi à l'extérieur.
Une fois la lampe installée, manipuler le *drum* avec très grande précaution pour ne pas la faire tomber et éclater à l'intérieur du drum, d'autant plus que ces lampes sont dispendieuses. Lorsque la lampe n'est pas installée, il est préférable de bouche la prise pour éviter l'accumulation de saletés.



Lors de l'utilisation de la lampe UV, il est primordial d'installer un compteur de lux pour savoir à quelle dose nos aérosols ont été exposés, mais aussi pour voir la performance de la lampe UV dans le temps (baisse d'intensité). La sonde est installée dans ce port et ne peut être que dans ce port, car c'est le seul qui a la bonne dimension.



La photo ci-contre illustre le montage en coupe transversale. Le fil USB de la sonde passe au travers un bouchon de silicone de taille 6. À la sortie du bouchon, du ZIP a été ajouté autour du fil pour éviter les fuites. Le fil passe ensuite au travers du port. Directement à l'entrée dans le drum, un écrou fixé sur la sonde est accoté sur le *bering* de manière à garder la sonde fixe et toujours dans la même position.



Le logiciel utilisé pour l'analyse de la lecture de la sonde (oak DAT) est de base. Il fournit des données en ampères et pour savoir la dose en mW/cm^2 il faut utiliser la formule suivante :

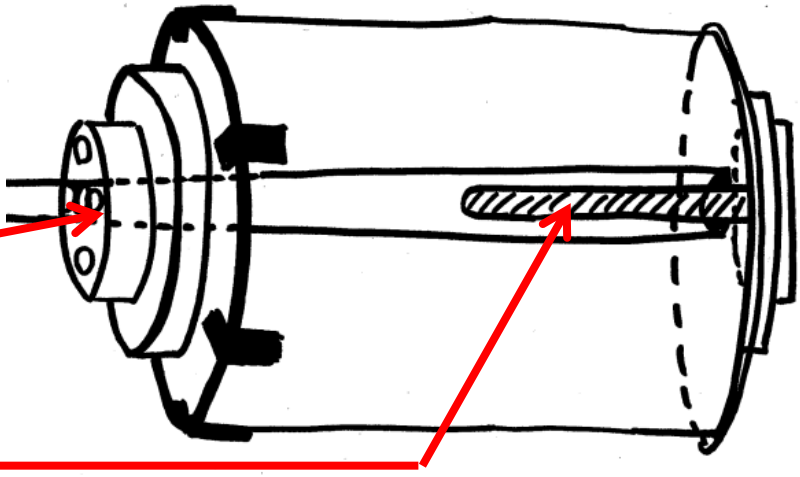
$$y = 0.625x - 2.5$$

Où *y* est exprimé en **mW/cm^2** et *x* en **mA.**

Pour ouvrir le *drum* pendant que la lampe UV est à l'intérieur, on conseille de faire passer un tuyau, d'un diamètre assez grand pour que la lampe UV puisse être glissée à l'intérieur, par l'un des ports du côté opposé à la lampe.

Cela évitera que la lampe bouge trop lors de l'ouverture, car possibilité d'être pas mal brassée.

Lampe UV

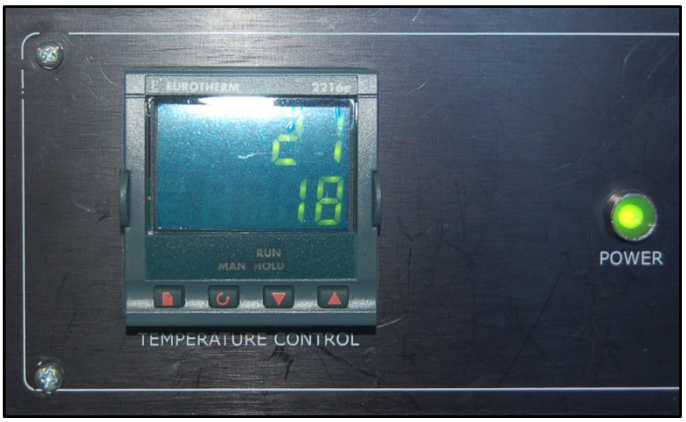


Contrôle de la température

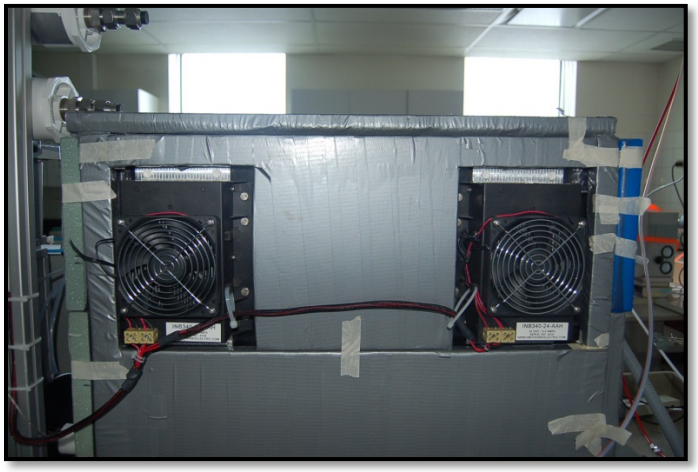
Le contrôle de la température se fait grâce à l'interface, située sous les desséchants, et reliée à des fours Pelletier situés derrière la chambre. Le bouton Power est situé à l'arrière du boîtier. On peut autant réchauffer que refroidir. Lorsque les fours sont en mode refroidissement, l'inscription OP2 doit être allumée, et lors du chauffage c'est l'inscription OP1 qui doit être allumée. Lorsqu'on change la température, il est important de vérifier que le nouveau chiffre a clignoté, démontrant qu'il a bel et bien enregistré cette nouvelle donnée. Le boîtier d'origine a été remplacé pour celui présent en ce moment lors de la certification de la chambre. Le nouveau est conforme et certifié CSA. Une sonde de température située dans la boîte de plastique est reliée au contrôleur de température afin de donner la température en temps réel et la moduler si elle n'est pas correcte. Si cette sonde n'est pas connectée au contrôleur de température, il ne fonctionnera pas et affichera le message d'erreur suivant : 5.br.

Vue d'ensemble sur le contrôleur de température.

Arrière du contrôleur de température. De gauche à droite : prise de courant reliée à la barre d'alimentation, interrupteur on/off, en jaune il s'agit de la connexion pour la sonde de température, le fil avec du rouge est relié aux fours Pelletier.



Vue rapprochée de l'interface situé à l'avant du contrôleur de température. Le chiffre du haut indique la température actuelle et le chiffre du bas la température voulue. On augmente ou diminue la température avec les flèches rouges. Les inscriptions OP1 et OP 2 vont apparaître à gauche du 21°C sur la photo. Les autres boutons servent à se déplacer dans le menu. Le manuel d'instruction du contrôleur et sur le groupe Duchaine.



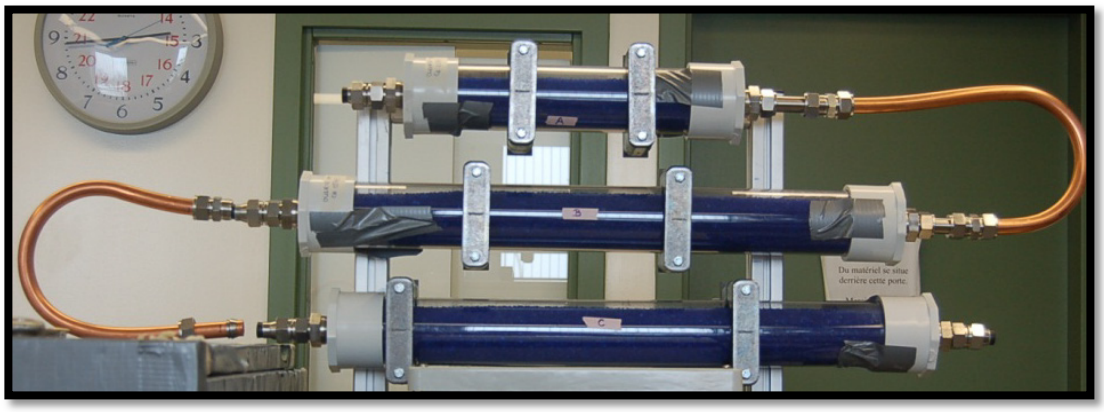
Fours Pelletier :
Faire attention de ne pas les obstruer.

Tubes de desséchants

La chambre environnementale est munie de trois tubes de desséchants qui permettent de moduler l'humidité des aérosols produits. Différents accessoires sont disponibles pour faire les montages tout dépendant de l'humidité désirée.

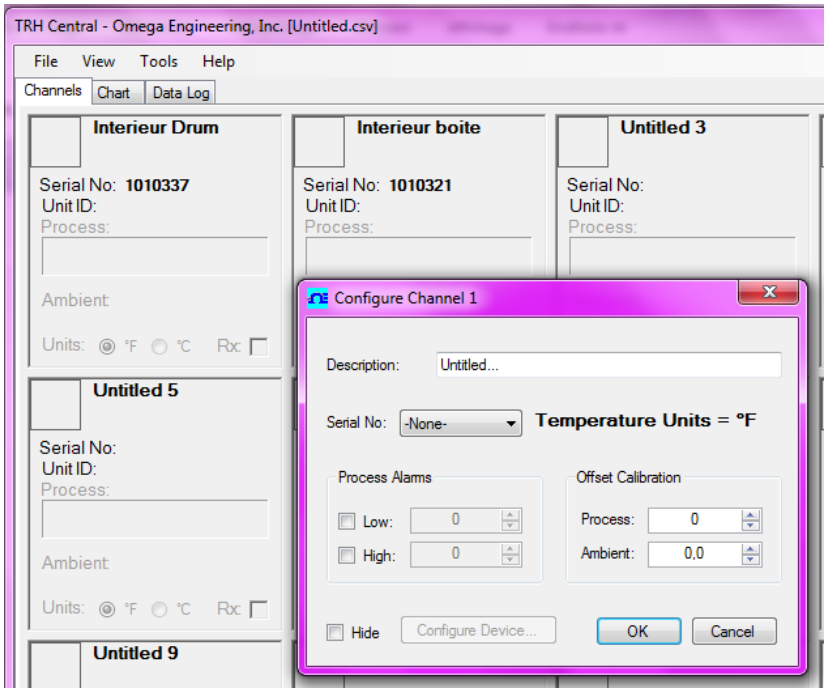
Les tubes de desséchants sont fermés à l'aide de bouchons blancs, mais qui ne sont pas visés et donc peuvent facilement se déplacer. Lors de la mise en place de différents montages, il est important de faire attention à ne pas mettre trop de force sur ces bouchons, autrement ils pourraient soit se briser ou tomber, et tout le desséchants va se retrouver au sol.

De plus, toujours avec les bouchons aux extrémités des tubes, il faut faire très attention à ne pas ouvrir l'air dans les tubes sans ouvrir une sortie d'air. Presqu'aussitôt le bouchon va être propulsé et tout le desséchants va se déverser une fois encore. Cela peut sembler anodin, mais il est très facile d'oublier d'ouvrir une valve étant donné la quantité qu'il y a à gérer. VÉRIFIER TROIS FOIS PLUTÔT QUE DEUX QUE TOUT VOTRE MONTAGE EST PRÊT.

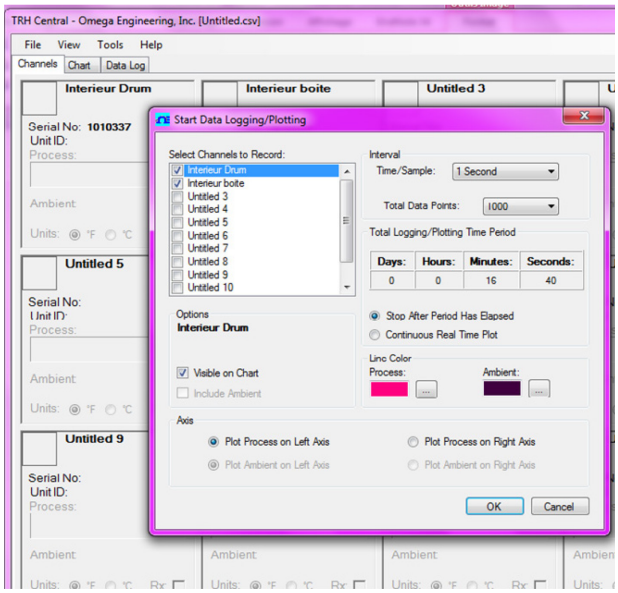


Sondes de température

Il y a 3 sondes de température : 2 USB pour prendre la température dans le *drum* et dans la boîte de plastique, et une reliée au contrôleur de température, tel que mentionné plus haut. Les deux sondes USB sont contrôlées par le logiciel TRH Central qui est très facile d'utilisation.



Une fois le logiciel installé sur un ordinateur, il faut configurer les sondes, qui sont les *channels* dans le logiciel. Donc il suffit de cliquer sur *Tools*, ensuite *Configure* et puis le *Channel* de votre choix (1,2,3...). Donnez-lui un nom dans *Description*. C'est aussi dans ce menu que vous pourrez arranger votre sonde si jamais elle est décalibrée, comme cela nous est arrivé. Nous n'étions plus capables de descendre l'humidité du *drum* à moins de 20%, mais lorsque nous avons vérifié l'humidité avec une autre sonde elle était à 0%. Donc il y avait un offset de 20% pour le *Process*. Le *Ambient* (température) était resté calibré. Ensuite, il était important de vérifier que même si nous avions changé le *offset*, la courbe de changement de la température n'avait pas changé. Pour ce faire, nous avons mis côte à côte notre sonde et une autre que nous savions calibrée, et avons observé leur comportement lorsque nous avons fait monter la température de la boîte.



Maintenant, pour commencer un enregistrement, il suivit d'aller dans *File*, *Star recording data*. Vous allez obtenir la fenêtre suivante. Il suffit de sélectionner les *channels* que vous voulez enregistrer ainsi que l'intervalle des mesures. Plus l'intervalle est court, moins il enregistre longtemps, donc s'assurer qu'il va enregistrer aussi longtemps que vous le voulez.

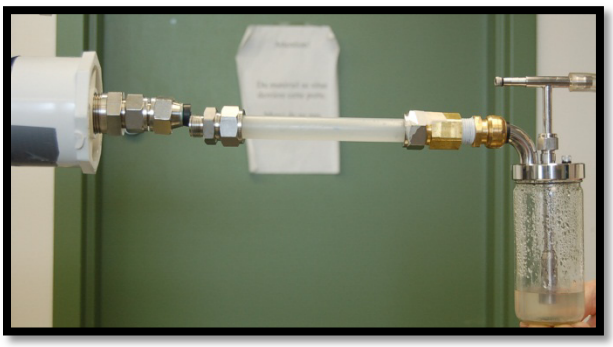
Il y a aussi la sonde kilog qui peut être utilisée, avec un logiciel très intuitif.

Montages possibles

Voici un aperçu des montages possibles avec le *rotating drum*.

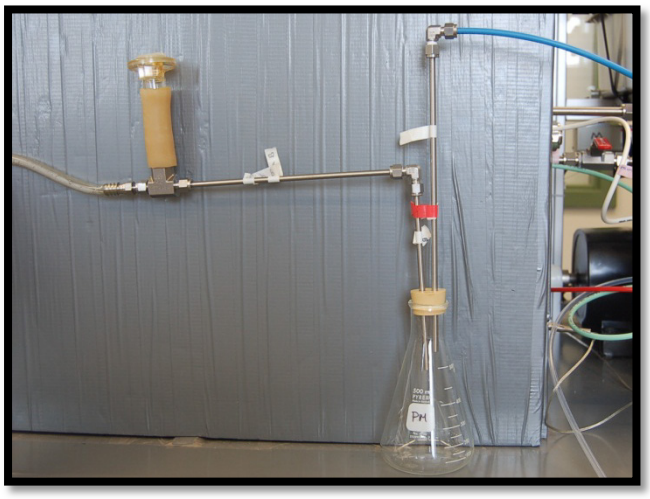
Collison

Le Collison peut être mis à plusieurs endroits tout dépendant de l'humidité de l'aérosol voulu. Il suffit de déplacer le raccord de couleur or, spécialement conçu pour le Collison. Lorsque mis sur les desséchants A et B, il a besoin d'une extension (voir photo). Il est TRÈS important d'ouvrir la valve avant d'envoyer de l'air dans le Collison. Il tolère très mal de hautes pressions et pourrait ÉCLATER.

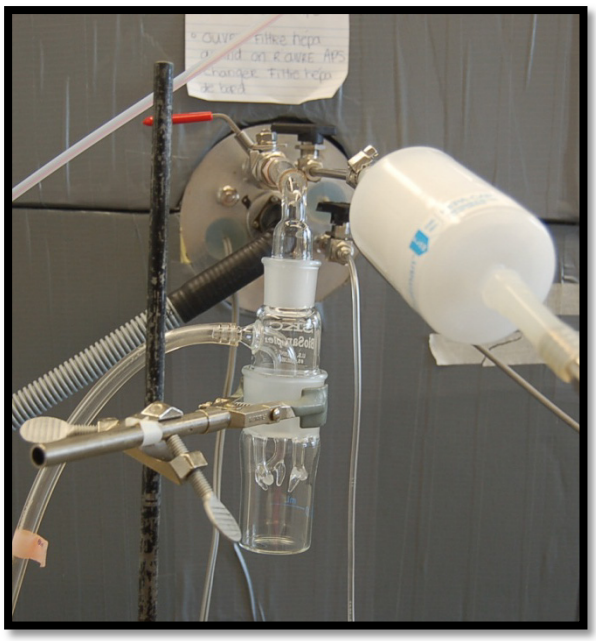


Aeroneb

Avec l'aeroneb, il est important de faire passer l'aérosol dans un erlenmeyer avant de le faire entrer dans le *drum*. Cela empêche l'accumulation d'eau dans les ports ou directement dans le *drum*. Pour savoir s'il y a de l'eau dans le *drum*, il suffit de suivre l'humidité. Si elle augmente toujours, même après une purge, il y a de l'eau.



Biosampler®



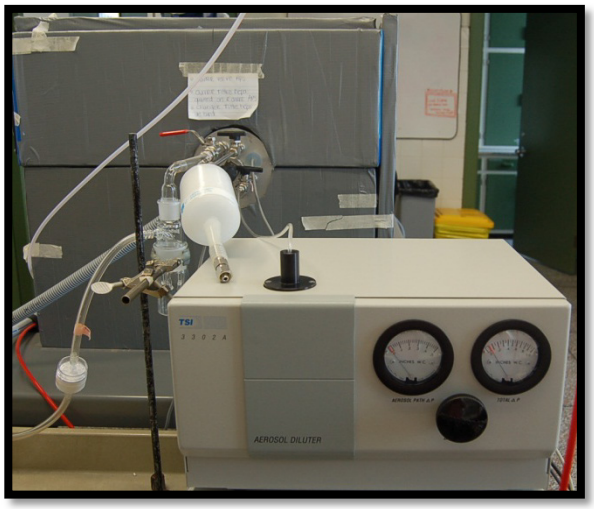
Le montage du Biosampler® est très simple. Celui-ci est relié à une pompe pour faire le vide et aspirer le contenu de la chambre. Il est important de changer le filtre HEPA de sens et ouvrir la valve du filtre HEPA. (Photo : extrémité gauche du *drum*). Ici le Biosampler® est soutenu par un support universel, la tubulure de gauche est reliée à la pompe.

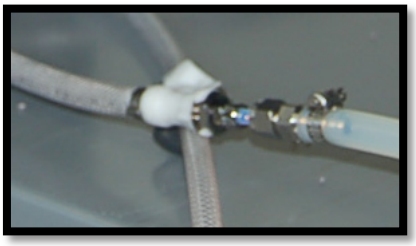
APS

Le montage de l'APS est aussi très simple. Il est important de ne pas oublier d'ouvrir la valve de L'APS, changer le filtre HEPA de sens et ouvrir la valve du filtre HEPA. Autrement, on peut briser l'APS.

Filtre HEPA

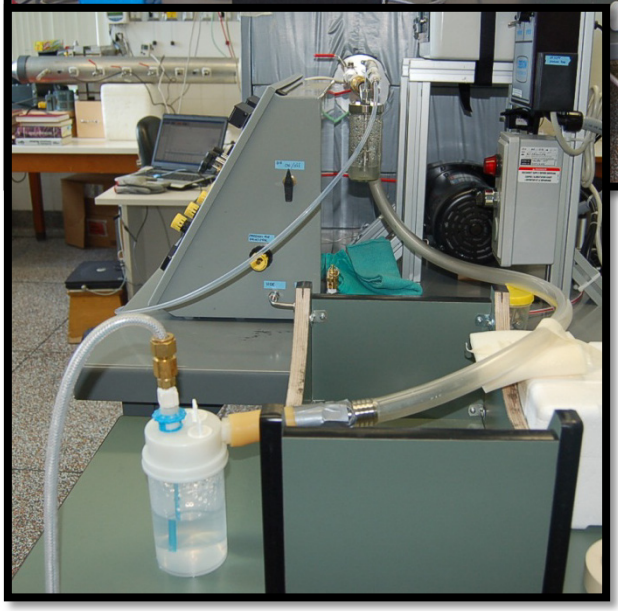
Changer lorsqu'il commence à changer de couleur ou si la pression est plus élevée quand on envoie de l'air. Ne pas oublier de le changer de sens tout dépendant de si on aspire ou envoi de l'air! C'est une manipulation très simple surtout avec des jonctions *quicklock* (voir photo).





Humidificateur de la chambre environnementale

On a eu recours à cet appareil pour obtenir 80% humidité relative à 30°C. Nous avions essayé une multitude de montages (Collison 6 jets, aeroneb+Collison 6 jets, Collison 24 jets, erlenmeyer avec eau en ébullition), mais aucun ne montait à plus de 65% d'humidité. Ce n'est qu'avec cet humidificateur que l'on peut atteindre cette humidité. Son fonctionnement est assez simple une fois qu'on a saisi comment installer la tubulure. Sur le côté droit de la boîte noire, ce qui contrôle l'humidificateur, il y a trois tubes :



To The Nebulizer : tube relié au nébuliseur (visé sur le dessus).
To The Chamber : il s'agit d'une entrée d'air pour faire fonctionner l'humidificateur. Branchez un filtre HEPA quicklock au bout de ce tube.

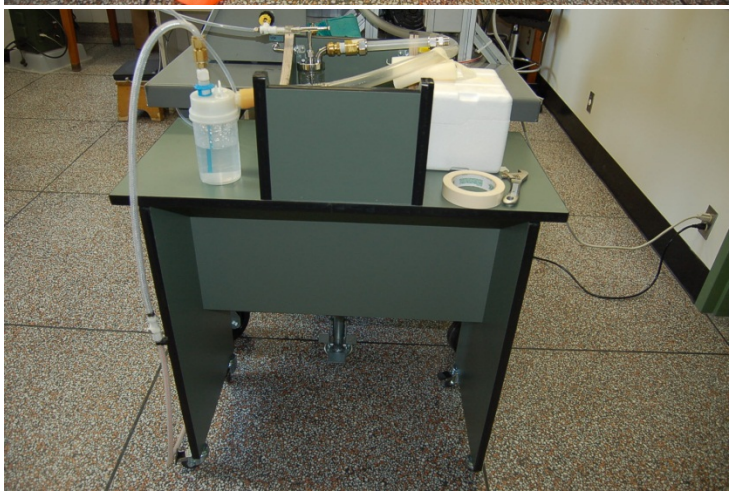
To The Train : normalement relié à trois desséchants. Simplement s'assurer que l'air peut circuler dans ce tube.

Pour actionner l'humidificateur, actionner le contrôleur (power à l'arrière), indiquer quelle humidité on désire avec les flèches de l'interface (chiffre du bas est humidité désirée et chiffre du haut est celle actuelle).
Important de mettre la sonde de cet humidificateur dans le *drum* pour qu'il sache à quelle humidité il est rendu.
Lors d'une expérimentation, on peut ajuster l'humidité avant d'envoyer notre échantillon, on peut aussi les envoyer en même temps pour être certain que l'humidité ne baisse pas, mais il est très important de fermer la valve de l'humidificateur s'il est à l'arrêt et que notre autre nébuliseur fonctionne toujours. Autrement, il y a un retour d'air dans l'humidificateur, ce qui le fait déborder et pourrait le briser, et on perd une partie de l'échantillon.
Puisque l'humidificateur produit beaucoup d'eau, il est préférable que les aérosols montent dans le tube de silicone avant d'entrer dans le *drum*. Ainsi, les plus grosses gouttelettes restent prises en bas (voir photo).

Supports pour le drum

Support vertical et horizontal

Important de ne pas laisser le drum dans sa position verticale trop longtemps.



Important de bien attacher le drum avec des sangles, car à cause de la roue à dent de scie qui permette de faire tourner le drum, l'un des côtés est plus lourd que l'autre et pourrait faire basculer le drum.

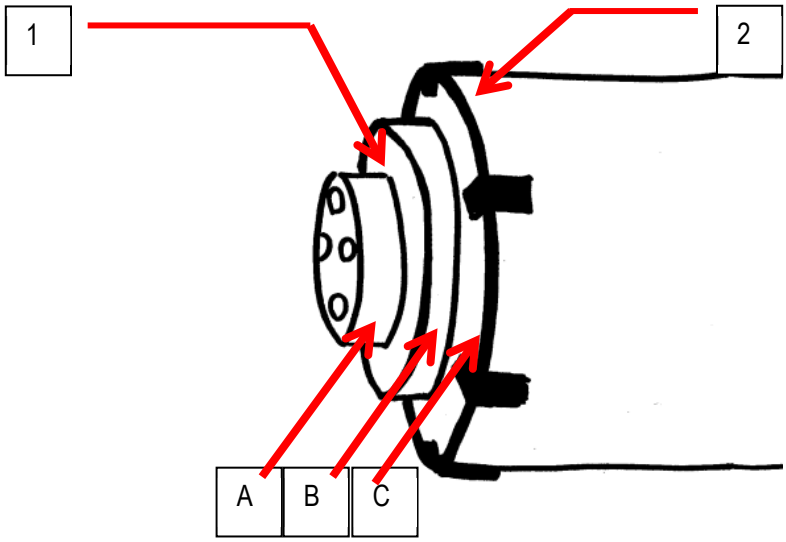
Trouble shooting

Il n'y a rien qui allume

Le drum est-il branché? La barre d'alimentation est-elle à ON? L'interrupteur du *drum* est-il à ON?

Fuites

Les fuites sont l'un des plus gros problèmes que l'on peut rencontrer avec le *drum*. Il faut s'armer de patience. La plupart des fuites proviennent de deux endroits précis :



D'abord, les pièces A, B et C de la figure ci-dessus ne sont pas soudées ensemble. Nous avons souvent observé des fuites entre les pièces A et B (fuite 1) et entre les pièces C et le cylindre du drum (fuite 2). La fuite 1 a été réglée en ajoutant du Mono entre les pièces A et B. La fuite 2 a finalement été réglée en ajoutant du *RightStuff* entre la pièce C et le cylindre du *drum*. Il faut se calculer une demi-journée de nettoyage lorsqu'on ouvre le *drum* pour enlever les deux scellants.
Pour tester s'il y a des fuites, ne pas envoyer directement l'air médical dans le drum (52 PSI), la pression est trop grande et si elle ne fait pas décoller le scellant, elle fera exploser les bouchons.

Eau dans le drum

Si après purge du drum (humidité remise à 0) elle ne cesse d'augmenter à nouveau, il y a probablement de l'eau dans le drum (trop de condensation). D'abord purger pendant une longue période de temps en prenant soin de faire entrer l'air à gauche, puis ensuite à droite pour assécher les deux extrémités. Si l'eau est toujours présente, il sera sûrement nécessaire d'ouvrir le drum.

Stabilité température et humidité

Le drum est capable de garder très stable l'humidité (plus ou moins 7% en 24H) et la température (plus ou moins 1°C). Si l'humidité n'est pas stable, c'est qu'il y a probablement des problèmes avec l'étanchéité (vérifier les fuites, revisser les jonctions).
Cependant, l'hiver, dans la pièce d'aérovirologie l'humidité relative est très basse (20%). Si vous devez travailler à très haute humidité, je vous conseille de déposer des linges humides à l'intérieur de la boîte de plastique du *drum*, cela permettra d'augmenter l'humidité extérieure au drum et de la rapprocher de celle du drum. Bien entendu, faire attention à ce que le linge soit seulement humide, on ne veut pas une flaque d'eau!

La sonde Kilog ne fonctionne plus

99% du temps c'est parce que les piles ne fonctionnent plus (à changer aux 6 mois).

Pas de particule dans le *drum*

Vérifier que tous les ports sont ouverts. Vérifier qu'il n'y a rien qui obstrue les connexions.

Nombre plus bas de particules qu'à l'habitude

Vérifier qu'il n'y a pas de fuites. Vérifier que c'est le bon facteur de dilution sur l'APS.

Mousse dans nébuliseur

Mettre de l'antifoam A.